

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

KEEMIA INSTITUUT
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Kairi Tõnsau

**TIRF-mikroskoopiaal põhinev biosensor süsteem HLA-G
määramiseks**

Magistritöö

Juhendajad: MSc. Taavi Võsumaa

Dr. Ago Rinken

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Viljatus ja <i>in vitro</i> viljastamine.....	6
1.1.1 Abistav reproduktiivmeditsiini tehnoloogia (ART)	6
1.1.2 IVF probleemid	6
1.1.3 Embrüo valimine - biomarkerid	7
1.2 Inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G).....	8
1.2.1 HLA-G geen	8
1.2.2 HLA-G ekspressioon	9
1.2.3 HLA-G funktsioonid	10
1.3 HLA-G ja rasedus	11
1.3.1 HLA-G ja embrüo – IVF edukus.....	12
1.4 HLA-G määramine embrüo kasvulahustest.....	13
1.4.1 ELISA.....	13
1.4.2 Luminex.....	14
1.5 Üksikute molekulide määramise võimalused TIRF süsteemiga.....	15
1.5.1 TIRF biosensori ehitus	15
1.5.2 TIRF mikroskoobi ülesehitus	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika	18
2.2.1 Klaaside puhastamine	18
2.2.2 Silaanimine	19
2.2.3 Klaaside pegüleerimine ja funktsionaliseerimine.....	19
2.2.4 TIRF mikroskoobi parameetrid	19
3. TULEMUSED JA ARUTELU	21

3.1	Funktsionaliseeritud sensorklaaside valmistamine	21
3.1.1	Üksikmolekulid funktsionaliseeritud klaasil	21
3.1.2	Mittespetsiifiline sidumine puhastatud klaasil	23
3.1.3	Mittespetsiifiline sidumine silaniseeritud klaasil	23
3.1.4	Mittespetsiifiline sidumine passiveeritud klaasil.....	24
3.1.5	Spetsiifiline sidumine funktsionaliseeritud klaasil	25
3.2	Neutravidini (NA) spetsiifiline sidumine pinnale.....	26
3.3	Biotiin-streptavidiin-biotiin interaktsiooni uurimine.....	27
3.4	Püüdmissantikeha MEM-G/9 spetsiifiline sidumine pinnale	28
3.5	SA-PE sidumise optimeerimine.....	29
3.6	ELISA	30
3.7	HLA-G „võileiva“ optimeerimine	31
3.7.1	HLA-G kontsentratsiooni vähendamine.....	32
KOKKUVÕTE		34
SUMMARY		35
TÄNUSÕNAD		36
KASUTATUD KIRJANDUS		37
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		41

KASUTATUD LÜHENDID

3'UTR	3' mittetransleeriv regioon (<i>untranslated region</i>)
5'URR	ülesvoolu paiknev regulatsiooniala (<i>upstream regulated region</i>).
ART	abistav reproduktiivmeditsiini tehnoloogia (<i>assisted reproductive technology</i>)
DPBS	Dulbecco fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
ELISA	ensüüm-immunosorbtsioonmeetod (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
F-BT	märgistatud biotiin (<i>Fitc-biotin</i>)
HLA-G	inimese leukotsüüdi antigeen G (<i>human leukocyte antigen G</i>)
ICSI	seemneraku intratsütoplasmaatiline injektsioon (<i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IVF	kehaväline viljastamine (<i>in vitro fertilization</i>)
LOD	avastamispiir (<i>limit of detection</i>)
MHC	koosobivuskompleks
NA	neutravidiin
NK	loomulikud tapjarakud (<i>natural killer cells</i>)
PEG	polüetüleen glükool (<i>polyethylene glycol</i>)
SA	streptavidiini
SA-PE	streptavidiin-fükoerütriini (<i>streptavidin phycoerythrin</i>)
sHLA-G	lahustuv inimese leukotsüüdi antigeen (<i>soluble human leukocyte antigen G</i>)
TIRFM	täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoop (<i>Total internal reflection fluorescence microscope</i>)

SISSEJUHATUS

Viljatus on ülemaailmne probleem, mis mõjutab ligikaudu 50 miljonit paari (Masharenhas *et al.*, 2012). Abi saamiseks pöörduvad inimesed tihti abistavate reproduktiivmeditsiini tehnoloogiate (ART) poole. Üheks kõige levinuimaks tehnoloogiaks on *in vitro* viljastamine (IVF), mille tagajärjel on tänase seisuga sündinud ligikaudu viis miljonit last. Siiski, ei too see meetod kaasa ainult õnnestumisi – ainult 30% inimestest saab probleemide korral abi. Selleks, et suurendada raseduse tõenäosust on saanud üldiseks tavaks kahe kuni kolme embrüo siirdamine. Eduka implantatsiooni korral võib sellega kaasneda aga mitmikrasedus, millega kaasnevad nii komplikatsioonid kui ka finantsiline ja emotsionaalne koormus.

Implantatsioon on abistava tehnoloogia üks kõige kompleksemaid teemasid. Kõikidest siirdatavatest embrüotest implanteerub ~30% (Heidari *et al.*, 2011). Selleks, et suurendada embrüote implantatsiooni tõenäosust ja vähendada siirdatavate embrüote arvu on vaja lisaks hetkel kasutuses olevale morfoloogilisele vaatlusele ka teisi meetodeid, et hinnata embrüo kvaliteeti.

Üheks selliseks mitteinvasiivseks meetodiks on biomarkerite kasutamine. Erinevatest biomarkeritest on HLA-G kõige potsentsiaalsem, kuna varasemalt on leitud seoseid HLA-G kõrge kontsentratsiooni ja eduka implantatsiooni vahel (Rebmann *et al.*, 2010; Fuzzi *et al.*, 2002). Kuna HLA-G-d ei suudeta aga iga kord tuvastada on tekkinud vajadus paremate (tundlikumate, kiiremate, odavamate) meetodite järgi.

Käesoleva töö eesmärgiks oli TIRF mikroskoopiaal põhineva biosensori väljatöötamine, mille abil oleks võimalik hiljem embrüo kasvulahustest HLA-G-d kvantifitseerida.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Viljatus ja *in vitro* viljastamine

Viljatus on tõsine ülemaailmne probleem, mille tasemed küll varieeruvad eri mandrite vahel (5 – 30%), kuid hinnatakse, et ligikaudu ühel paaril kümnest esineb kas primaarne või sekundaarne viljatus (WHO, 2002). Viljatust ehk infertiilsust defineeritakse kui võimetust 12 kuu jooksul peale kaitsmata seksuaalvahekorda rasestuda ning naisel rasedust edukalt lõpuni kanda. Primaarse viljatuse korral ei ole suudetud kunagi rasestuda või rasedust lõpuni kanda (Adamson ja Baker, 2004) ja sekundaarse viljatuse korral ei ole suudetud peale esmakordset sünnitust viimase aasta jooksul uuesti rasedaks jääda.¹

1.1.1 Abistav reproduktiivmeditsiini tehnoloogia (ART)

Paljud paarid, kes ei suuda ise rasestuda pöörduvad abi saamiseks abistavate reproduktiivmeditsiini tehnoloogiate (ART) poole. ART hõlmab endas kõiki viljatusravisid, kus töötatakse nii sugurakkude kui ka embrüote manipulatsiooniga. Üldiselt kujutab ART protseduur endas järgmisi protsesse: kõigepealt eemaldatakse naise munasarjast munarakud; seejärel viiakse munarakk laboratoorselt kokku seemnerakuga, et toimuks munarakku kunstlik viljastamine ja kui viljastatud munarakust on arenenud embrüo siirdatakse see tagasi naise emakasse.²

Kõige populaarsemaks ART tehnoloogiaks on IVF ehk kehaväline viljastamine (ingl. k. *in vitro fertilization*), kus munarakk viiakse kokku seemnevedelikuga. Aja jooksul on IVF-ist arendatud ka mitmeid modifikatsioone, millest kõige sagedasem on ICSI ehk seemneraku intratsütoplasmaatiline injektsioon (ingl. k. *intracytoplasmic sperm injection*). Selle meetodi puhul valitakse mikroskoobi all välja üksainus seemnerakk, mis süstitakse otse munarakku (Adamson ja Baker, 1992).

1.1.2 IVF probleemid

IVF sai alguse aastal 1978, kui sündis esimene kunstliku viljastamise teel sündinud laps, Louise Brown (Steptoe ja Edwards, 1978; Wang ja Sauer, 2006). Alates sellest ajast on tänu IVF-ile maailmas sündinud üle 5 miljoni lapse (ESHRE Guidelines and Legal. ART fact sheet, 2013). Kuid kuigi IVF on tunduvalt edukam kui teised meetodid, ei taga IVF endas

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0002173/>

² <http://www.cdc.gov/art/>

ainult õnnestumisi, sest ligikaudu 70% paaridel, kes läbivad mitmeid IVF tsükleid, ei ole õnnestunud rasestuda (Wunder *et al.*, 2013).

Kompenseerimaks suhteliselt madalaid implantatsiooni tasemeid on üldiseks tavaks saanud kahe kuni kolme kõige kvaliteetsema embrüo siirdamine emakasse, et suurendada vähemalt ühe embrüo implantatsiooni tõenäosust (Paul-Simon, 2011). Sellega kaasneb aga oht eduka raseduse korral kaksikute (30%) või kolmikute (4%) sünniks (Adamson ja Baker, 2004). Mitmikrasedusega võib kaasneda suur emotsionaalne ja finantsiline koorem nii patsiendile, perekonnale kui ka ühiskonnale (Practice Committee, 2006). Samuti paneb mitmikrasedus nii ema kui ka loote suurenenud tervisliku riski alla põhjustades komplikatsioone, puudeid või isegi surma. Mitmikrasedusega kaasneb tihti imikute enneaegne sündimine koos kõigi sellele järgnevate tagajärgedega; ka emad on raseduse ajal suurenenud riski all – võivad tekkida hüpertensiivsed häired (nt. preeklampsia), rasedusdiabeet ja verejooksud. Mitmikraseduste riski saaks vähendada piirates siirdatavate embrüote arvu (Paul-Simon, 2011).

1.1.3 Embrüo valimine - biomarkerid

ART puhul on optimaalse implantatsiooni potentsiaali tagamiseks väga oluline kõige implantatsioonvõimelisemate embrüote valimine. Antud hetkel toimub embrüote valik morfoloogiliste parameetrite alusel (embrüo vaatlus mikroskoobiga), mis ei ole alati usaldusväärne (Huang ja Rosenwaks, 2012), kuna implanteerub ainult 30% morfoloogiliste tunnuste alusel väljavalitud embrüotest. Embrüote kvaliteedi ja arengupotentsiaali määramiseks on seega vaja täiendavaid mitteinvasiivseid meetodeid.

Üheks selliseks mitteinvasiivseks meetodiks on viimasel ajal välja pakutud erinevate embrüote poolt sekreteeritavate biomarkerite kasutuselevõttu, mida saaks ohutult tuvastada analüüsides embrüot ümbritsevat kasvukeskkonda. Biomarkerid, mis aitaksid hinnata embrüote kvaliteeti, aitaksid välja valida kõige elujõulisemaid embrüoid suurendades üksikute embrüote siirdamise tõenäosust, vähendades seeläbi mitmikrasedust ja tõstes summaarset raseduste arvu. Kõige perspektiivsemaks biomarkeriks on hetkel HLA-G, mille tuvastamine embrüo kasvulahustes korreleerub mitmete uurimisgruppide hinnangul IVF-i tulemuslikkusega (Rebmann *et al.*, 2007; Fuzzi *et al.*, 2002; Rizzo *et al.*, 2007).

1.2 Inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G)

Inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G) on mitteklassikaline klass Ib koeshobivuskompleksi (MHC) molekul, mida inimestes kutsutakse inimese leukotsüüdi antigeeniks (HLA) (Hunt, *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2001). Teda nimetatakse mitteklassikaliseks, kuna erinevalt teistes kõrge polümorfismiga klassikalistest HLA molekulidest iseloomustab teda a) piiratud polümorfism, b) piiratud koejaotuvus ja c) unikaalne alternatiivse splaissingu muster, mis toodab palju seitsset eri isovormi (Cecati *et al.*, 2011; Ishitani ja Geraghty, 1992; Ellis *et al.*, 1986).

1.2.1 HLA-G geen

HLA-G on kodeeritud geeni poolt mis asub 6. kromosoomi lühikeses õlas (lookus 6p23.1) – üks kõige polümorfseimaid regioone inimese genoomis. HLA-G geen klooniti esmakordselt aastal 1987 ja teda kirjeldati kui peamist koeshobivuskompleksi (MHC) klass Ib geeni, mille struktuur on homoloogne teistele HLA klass I geenidele (Ellis *et al.*, 1986). Sellel geenil on samuti klass Ia geenidele (HLA-A, HLA-B ja HLA-C) identne intron/ekson organisatsioon. HLA-G geen on 4170 aluspaari pikk ja koosneb 8 eksonist, mis kodeerivad molekuli rasket ahelat (Durmanova *et al.*, 2013; Roussev ja Coulam, 2007).

Ekson 1 kodeerib peptiidsignaali samas kui eksonid 2, 3 ja 4 kodeerivad vastavalt ekstratsellulaarseid $\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\alpha 3$ domeene. Ekson 5 kodeerib transmembraanset domeeni ja eksonid 6 ja 7 tsütoplasmaatilisi domeene. Ekson 7 on alati puudu täispikalt mRNA-t tänu eksonis 6 asuvale stop koodonile, mille tulemusena moodustub lühendatud (truncated) tsütoplasmaatiline saba (joonis 1) (Hunt *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2001).

1.2.1.1 Transkriptsioon

On näidatud, et HLA-G primaarne transkript toodab seitsset alternatiivset mRNA-d, mis on võimalised kodeerima nelja membraanseoselist (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) ja kolme lahustuvat (HLA-G5, -G6, -G7) palju isovormi (Roussev ja Coulam, 2007). HLA-G1 on täispikk HLA-G molekul, HLA-G2-l puudub ekson 3, HLA-G3-l puuduvad eksonid 3 ja 4 ja HLA-G4-l puudub ekson neli. HLA-G1 kuni G4 on membraanseoselised molekulid tänu transmembraansele ja tsütoplasmaatilisele osale, mis on kodeeritud eksonite 5 ja 6 poolt. HLA-G5 on sarnane HLA-G1-le, kuid tal on olemas ekson 4, HLA-G6-l puudub ekson 3, aga on olemas intron 4 ja HLA-G7-l puudub ekson 3, aga on olemas intron 2. HLA-G5 ja -G6 on

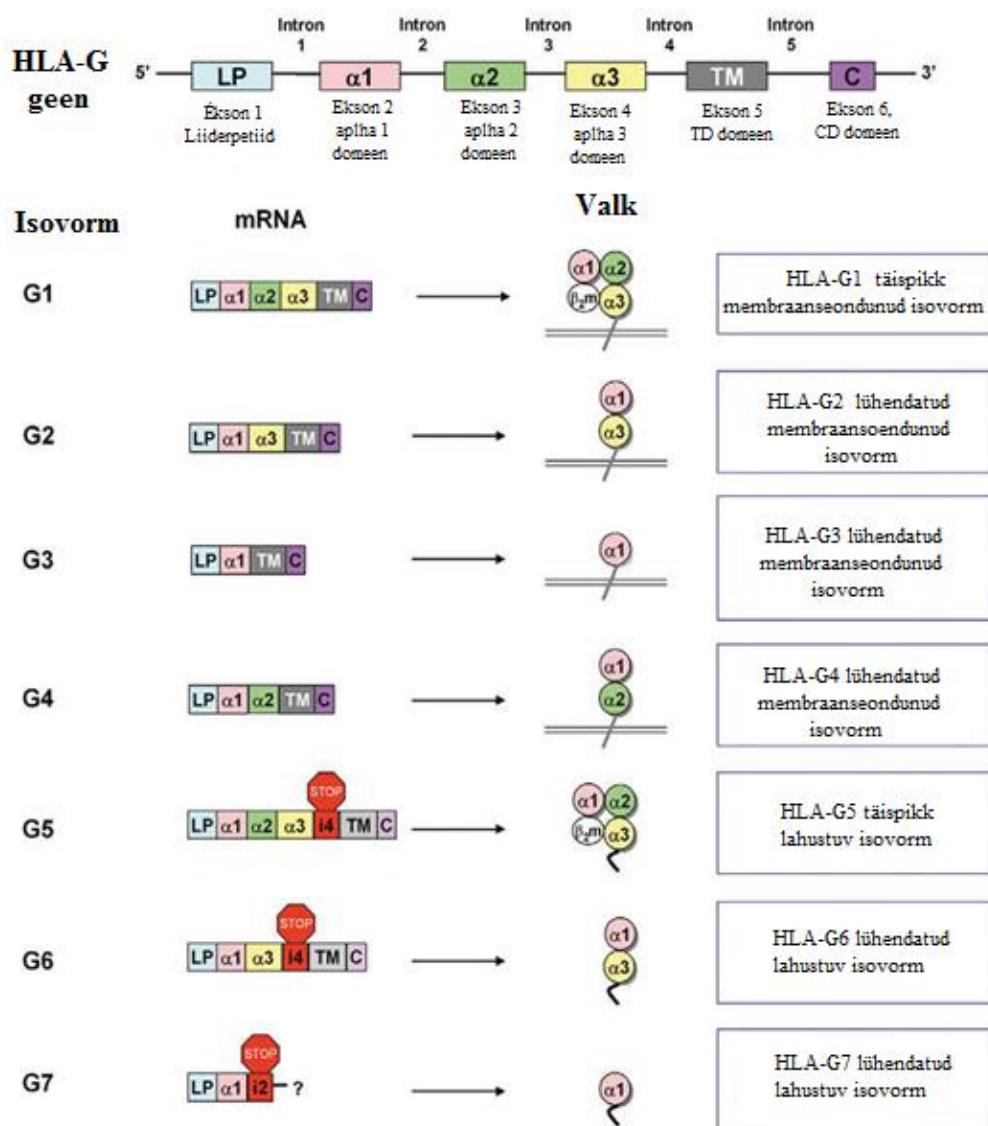
lahustuvad vormid tänu intronile 4 mis sisaldab enneaegset stoppkoodonit tänu millele ei toimu transmembraanse ja tsütoplasmaatilise osa translatsiooni (joonis 1). (Hunt *et al.*, 2005; Sargent, 2005).

1.2.2 HLA-G ekspressioon

HLA-G geen kodeerib valke, mis erinevad klassikalise HLA klass I antigeenidest (A, B ja C) selle poolest, et on madala polümorfisusega ja tema ekspressioonis ait on äärmiselt piiratud. HLA-G valgu ekspressiooni on peamiselt leitud platsenta ekstravilloosetes tsütotrofoblasti rakkudes, kuid ka preimplanteerunud embrüotes, tüümuses, sarvkestas, endoteeli rakkude eelrakkudes, küüne matriksis ja pankreases (Jurisicova *et al.*, 1996; Carosella *et al.*, 2003). HLA-G ekspressiooni indutseeritakse patoloogiliste seisundite korral nagu kasvaja, viirusinfektsioonid ja autoimmuunhaigused (Rebmann *et al.*, 2007).

HLA-G täispika valgu produkt on 86% ulatuses sarnane HLA klass I antigeenidele. Ta koosneb rasekest α ahelast (37 – 30 kDa), mis on erinevalt teistest klass I valkudest madalam tänu eksonis 6 asuval stoppkoodonile, mille tagajärjel toimub tsütoplasmaatilises osas kuue aminohappe deletsioon, ja tema külge mittekovalentselt seondunud $\beta 2$ mikroglobuliinist (12 kDa) (Rousse ja Coulam, 2007; Warner *et al.*, 2008).

HLA-G täispikk valk esineb heterodimeeri kujul, mis koosneb globulaarsetest ekstratsellulaarsetest domeenidest ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\alpha 3$ domeenid, transmembraansed ja tsütoplasmaatilised domeenid) ja selle külge mittekovalentselt seondunud kergest ahelast ($\beta 2$ -mikroglobuliin). Kerge ahel on kodeeritud viieteistkümnendas kromosoomis asuva geeni poolt (Durmanova *et al.*, 2013). HLA-G1 on täielik isovorm, kuna on seostunud $\beta 2$ -mikroglobuliiniga. HLA-G2 isovormil ei ole $\alpha 2$ domeeni, samas kui HLA-G3-l ei ole $\alpha 2$ ja $\alpha 3$ domeene ja HLA-G4-l ei ole $\alpha 3$ domeeni. HLA-G lahustuvad isovormid HLA-G5 – G7 on vastavalt HLA-G1, -G2 ja -G3 lahustuvad analoogid. Lahustuvad isovormid erinevad teistest isovormidest ainult oma C-otsa poolest: transmembraanne ja tsütoplasmaatiline osa on asendatud lühikese hüdrofoobse sabaga, mis on kodeeritud intron 4 (HLA-G ja HLA-G6) või intron 2 (HLA-G7) 5' järjestuse poolt (joonis 1) (Roussev ja Coulam, 2007). HLA-G1 mimikeerib samuti tõelisi lahustuvaid isovorme kuna teda saab raku pinnalt proteolüütiliselt lõigata või heita (LeMaout *et al.*, 2003). Intron-kodeeritud aminohapete olemasolu võimaldab vahet teha heidetud (*shed*) või proteolüütiliselt lõigatud HLA-G molekulide ja lahustuvate isovormide vahel (Roussev ja Coulam, 2007).



Joonis 1. Inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G geen ja HLA-G isovormid). HLA-G geen kooseb 8 eksonist. Ekson 1 kodeerib liiderpeptiidi (LP); eksonid 2, 3 ja 4 ekstratsellulaarseid $\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\alpha 3$ domeene; ekson 5 raske ahela tsütoplasmaatilist domeeni (CD) ja ekson 6 transmembraanset domeeni (TD). Eksonid 7 ja 8 on mittekodeerivad ja ei ole seetõttu joonisele märgitud. HLA-G valgul on sama struktuur nagu HLA klass I antigeenidel (üks raske ahel α ja üks kerge ahel $\beta 2m$). Primaarse transkripti alternatiivsel splaissingul saab luua seitse HLA-G isovormi. Neli isovormi – HLA-G1, -G2, -G3 ja -G4 – on membraanseonduvad, kolm isovormi – HLA-G5, -G6 ja -G7 – on lahustuvad. 5'URR – „ülesvoolu paiknev regulatsiooniala (upstream regulated region); 3'UTR – 3' mittetransleeriv regioon (untranslated region). (Modifitseeritud - Warner *et al.*, 2008)

1.2.3 HLA-G funktsioonid

On näidatud, HLA-G on immuunsusele tolerogeenne molekul mis mängib olulist rolli immuunvastuse mahasurumises (Alegre *et al.*, 2007). Algselt arvati, et HLA-G hoiab ära immuunvastuse emapoolsete tsütotoksiliste lümfotsüütide poolt ja kaitseb sihtmärkrakke loomulike tapjarakkude (NK) vahendatud tsütolüüsi eest. Immunomodulatsioon läbi

tsütokiinide sekretsiooni loob ühelt poolt embrüo ja teiselt poolt ema immuntolerantsuse mehhanismide vahel nn. „keemilise dialoogi“. Varasemates uuringutes on näidatud, et HLA-G valgud reguleerivad immuunrakke nagu T-rakud, antigeeni esitlevad rakud ja NK rakud. Kui rekombinantset HLA-G-d kasvatati koos IL-15-stimuleeritud emaka mononukleaarsete rakkudega oli CD4⁺ T rakkude proliferatsioon inhibeeritud; samas, nii interferoon- γ kui ka tuumori nekroosi faktor- α tootmine NK rakkude poolt suurenes. Erinevalt membraanseondunud HLA-G-st ei mõjutanud sHLA-G emaka mononukleaarsete rakkude loomulikku tsütotoksilist aktiivsust.

Rekombinantne sHLA-G stimuleerib tugevalt TGF- β 1 produktsiooni aktiveeritud antigeeni esitlevate rakkude poolt. In vitro uurimused on demonstreerinud lahustuva ja membraanseonduva HLA-G omadust moduleerida tsütokiinide vabastamist inimese allogeense perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest. Lahustuv HLA-G surub maha NK rakkude funktsionaalset aktiivsust ja inhibeerib NK rakkude vahendatud tsütotoksilisust.

Kokkuvõtvalt viitavad uuringud sellele, et HLA-G funktsioon on moduleerida tsütokiinide sekretsiooni suurendamiseks immunotolerantsust ja kontrollida trofoblastide invasiooni (Roussev ja Coulam, 2007).

1.3 HLA-G ja rasedus

Rasedust on sageli peetud paradoksiks. Immunoloogilisest vaatepunktist vaadates võib loodet pidada semi-allogeenseks siirdeks (graftiks), kuna pool loote genoomist pärineb isalt. Siiski normaalse raseduse ajal ei hülga ema immuunsüsteem loodet, kuigi see on nn. „võõras“, kuna arendatakse terve rida tolerogeenseid mehhanisme, et lubada raseduse teket ja seeläbi tervete beebide sünni (Bouteiller ja Mallet, 1997). Medawar oli esimene, kes aastal 1953 alustas raseduse ajal toimuvate mehhanismide uurimist, mis väldivad loote/embrüo äratõukamist. Ta pakkus välja kaitsvate mehhanismide olemasolu, mis võivad stimuleerida emas tolerantsust (Medawar, 1953). Põhilist rolli rasedusel mängivad tsütokiinid, kasvufaktorite integriinid ja prostaglandiinid (Speroff *et al.*, 2005). Ka ema immuunsüsteem on implantatsiooni protsessis kriitiline komponent. Normaalse raseduse jooksul läbib ema immuunsüsteem erinevad muutused, mis viivad tolereerimiseni (Fisch *et al.*, 2007).

HLA-G spetsiaalne struktuur, eriti tema madal polümorfsus, on oluline tunnus, miks teda võidakse plantsentas ekspresseerida, ilma äratõukamiseta ema immuunsüsteemi poolt (Bainbridge *et al.*, 2001). Samuti ka fakt, et kõikidel trofoblasti rakkudel, nii villoossetel kui ka ekstravilloossetel, puudub HLA klass II ja klassikalise HLA klass I molekulide ekspressiooni, et vältida interaktsioone emapoolsete tsütotoksiliste T-rakkudega. Trofoblasti

rakud ekspresseerivad aga HLA-G-d. (Marti *et al.*, 2007; Dahl ja Hviid, 2012). HLA-G ekspresseeritakse juba blastotsüsti staadiumis kus see on oluline implantatsiooniks ja varajaseks ema-loote tolerantsiks (Fuzzi *et al.*, 2002).

HLA-G molekulid, mida ekspresseeritakse ema-loote ühenduskohas ei ole ainukesed olulised molekulid, mis suurendavad rasestumise edukust. Oluline on ka sHLA-G molekulide leidumine ema plasmas (Rizzo *et al.*, 2011). On täheldatud lahustuvate HLA-G molekulide taseme tõusu rasedate naiste plasmas esimese trimestri jooksul võrreldes naistega, kes ei olnud rasedad (Steinborn *et al.*, 2007). Vastupidiselt aga sHLA-G plasma tasemed vähenesid kolmanda trimestri jooksul (Hackmon *et al.*, 2004; Yie *et al.*, 2005) ja tõusid järsult sünnituse jooksul (Rizzo *et al.*, 2008) arvatavasti tänu platsenta membraanseoseliste HLA-G molekulide levimise tõttu. sHLA-G kontsentratsiooni rasedate naiste seerumis/plasmas seostatakse kliinilise raseduse tulemustega. Naistel, kes läbisid IVF-i, aga kellel esines varajase raseduse jooksul iseeneslikke aborte, oli ovulatsioonieelses perioodis ja raseduse jooksul madalam sHLA-G tase kui naistel, kellel esines normaalne rasedus (Pfeiffer *et al.*, 2000). Samuti on sHLA-G taseme vähenemist, nii ema seerumis kui ka loote platsenta rakkudes, seostatud preeklampsiaga (Yie *et al.*, 2005).

1.3.1 HLA-G ja embrüo – IVF edukus

sHLA-G embrüonaalne sekretsioon on väidetavalt üks kõige lootustandvamaid markereid embrüote arengupotentsiaali hindamiseks ja rasestumise ennustamiseks peale ART-i (Warner *et al.*, 2008). Esimene märge sHLA-G ekspressioonist preimplanteerunud inimese embrüotest saadi Jurisicova *et al.* poolt kasutades RT-PCR ja immunotsütokeemiat. Tema poolt läbi viidud uurimuses tuvastati HLA-G mRNA-d kõikides arenguetappides ootsüüdist kuni blastotsüstini. Samuti oli HLA-G positiivsetel blastotsüstidel jagunemine kiirem kui blastotsüstidel, kus puudus HLA-G mRNA ekspressioon (Jurisicova *et al.*, 1996). Blastotsüstide jagunemise kiirus on üks morfoloogilistest tunnustest mida embrüote selektsioonil jälgitakse (Steer *et al.*, 1992).

Esimene uurimus, kus näidati, et sHLA-G kontsentratsioon IVF embrüote kasvulahuses korreleerub positiivselt nii lõigustumise kiiruse kui ka hilisema implantatsiooni potentsiaaliga tehti Fuzzi *et al.* poolt (Fuzzi *et al.*, 2002). Tuvastati lahustuvaid HLA-G (HLA-G1 ja -G5) isovorme, kuna neid ekspresseeritakse enamikes embrüotes (Yao *et al.*, 2005). See uurimus on viinud paljude teiste uurimusteni, kus on üritatud leida seos HLA-G kontsentratsiooni ja IVF edukuse vahel.

Hiljutiste andmete kohaselt on leitud, et sHLA-G määramine embrüo kasvulahustest aitaks IVF edukust tõsta mitme embrüo siirdamise korral 30.8%-lt 40,7%-ni. Üksiku embrüo siirdamise korral tõuseks IVF edukus aga 13%-lt 26%-ni (Rebmann *et al.*, 2010). Isegi kui sHLA-G tuvastamine on korrelatsioonis üleüldise embrüo morfoloogilise hindamisega suurendab see võimalust valida embrüo, mis suure tõenäosusega implanteerub, võrreldes praktikaga, kus kasutatakse ainult morfoloogilist hindamist (Warner *et al.*, 2008).

1.4 HLA-G määramine embrüo kasvulahustest

Erinevates uurimustes on leitud nii märkimisväärselt erinevaid tulemusi HLA-G positiivsete ja HLA-G negatiivsete embrüote vahel, kuid kirjeldatud on ka sarnasusi. Faktorid, mis võivad tulemusi mõjutada on erinevate ELISA testides kasutatavad parameetrid (kasutatavad antikehad, substraat, referentsproovid). Tulemusi võivad mõjutada ka erinevad embrüokultuuride tehnikad (meediumi tüüp, proovi ruumala, proovi kogumise päev, embrüote arv kultuuris) või proovide säilitamise meetod (Rebmann *et al.*, 2010; Warner *et al.*, 2008). Tänu erinevatele parameetritele saadakse erinev tuvastamispiir, tundlikus ja spetsiifilisus. Kõige sagedamini kasutatakse HLA-G määramisel ELISA testi, kuid viimasel ajal on hakatud kasutama ka Luminex xMAP tehnoloogial põhinevat meetodit.

1.4.1 ELISA

Antikehasid saab kasutada spetsiifiliste analüütiliste reagentidena, et kvantifitseerida valkude või teiste antikehade koguseid. Üheks selliseks on ELISA-ks. Meetodi põhimõte seisneb selles, et ensüüm, mis reageerib värvitu substraadiga, et luua värviline produkt, on kovalentselt seotud spetsiifilise antikehaga, mis tunneb ära sihtmärk antigeeni. Kui antigeen on lahuses olemas, seondub sellega antikeha-ensüüm kompleks ja ensüüm komponent sellest kompleksist viib läbi katalüüsi reaktsiooni, mis viib värvunud produktini. Värvunud produkti tekkimine viitab antigeeni kohalolule.

ELISA „võileib“ võimaldab korraga nii antigeeni tuvastamist kui ka kvantifitseerimist. Vastava antigeeni antikeha on seondunud süvendi põhja. Järgmiseks lisatakse antigeen, mis seondub antikeha külge. Lõpuks lisatakse teine, immuunmärgisega antikeha. Selle meetodid puhul vastab reaktsiooni määr olemasolevale antigeenile. Selline meetod on kiire ja mugav (Berg *et al.*, 2002).

ELISA-l on aga omad puudused. HLA-G määramiseks, mille kontsentratsioon kasvulahustes on keskmiselt 5-6 pM, on selline tundlikus liiga väike (Rebmann *et al.*, 2010; Exbio). Kuna ELISA-t teostatakse mikroplaatidel, mille süvendid on kaetud püüdmisantikehaga, siis nõuab see meid huvitava antigeeni püüdmiseks suhteliselt suuri proovi koguseid (50 – 100 µl). Embrüote kasvulahuste ruumalad varieeruvad aga 10 – 1000 µl-ni (Rebmann *et al.*, 2007). Süvendite suhteliselt suur pindala ja püüdmisantikeha hüdrofoobne seondumine võivad viia mittespetsiifilise sidumiseni ja suurenenud taustamürani. Lisaks on enamikse ELISA-de puhul mõistliku tundlikuse saavutamiseks vajalik võimendatud ensüümvahendatud signaal. Selline võimendus ei ole alati lineaarne ja võib seega tulemusi moonutada. (Baker *et al.*, 2012).

1.4.2 Luminex

Luminex xMAP tehnoloogia on voolutsütomeetriaal põhinev mikrokerakeste platvorm, kus erinevalt ELISA-st püütakse analüüt mitte keemiliselt modifitseeritud süvendi põhja, vaid süvendi lahuses olevate mikrokerakeste külge. Luminex xMAP mikrokerakesed on enamasti 5,6-mikromeetrise läbimõõduga polüstüreen osakesed, mis on täidetud punaste ja infrapunaste fluorokroomide seguga. Kerakeste pinnale saab kovalentselt siduda püüdmisantikehasid ja proove. Proovide uurimiseks on vajalik spetsiaalne aparatuur – iga mikrokerakest uuritakse spetsiaalses läbivoolutsütomeetriaal meenutavas instrumendis, mis on varustatud kahe laseriga (Corrie *et al.*, 2011). 532 nm laser ergastab R-füköerütriin reporterimolekuli, mis on seotud mikrokerakeste pinnale ja hindab kerakese pinnale seondunud proovi kogust. 635 nm punane dioodlaser ergastab kahte mikrokerakeses asuvat nn. tuvastamise fluorokroomi. Sekundis loetakse tuhandeid mikrokerakesi, mille tulemusena analüüsib süsteem kuni 100 erinevat reaktsiooni ühes reaktsioonikoguses mõne sekundiga proovi kohta (Baker *et al.*, 2012; Dunbar, 2006).

Kuna kerakese pindala on väike piisab erinevalt ELISA-st analüüsimiseks väiksest kogusest proovist. Mittespetsiifiline sidumine väheneb samuti märkimisväärselt. Siiski ei suudeta HLA-G-d tuvastada ~ 80% embüotest (Rebmann *et al.*, 2010). Et seda protsenti vähendada oleks vajalik veel tundlikumat süsteemi, millega saaks Luminexi-ga tulemusi võrrelda ja võimalusel veelgi täpsemalt määrata.

Potentsiaalselt tundlikum on nn. „ühe molekuli“ määramise meetod (Jane, *et al.* 2012), kus on võimalik müra allikaid maha suruda. Üheks tundlikuks meetodiks, millega üksikmolekule määrata on TIRF (täieliku sisepeegeldusega fluorestsents) mikroskoobil põhinev biosensor.

1.5 Üksikute molekulide määramise võimalused TIRF süsteemiga

TIRF mikroskoop võimaldab luua ELISA sarnase ülesehitusega sensori, mille tundlikkus on suurem ühe-molekuli tasemel määramistäpsuste arvelt. Valkude üksikmolekulide analüüs võimaldab tundlikku valkude kvantifitseerimist ja on sobilik biomarkerite tuvastamiseks.

Tessler ja Mitra poolt läbi viidud uurimuses võrreldi omavahel üksikmolekulide lugemist (digitaalne signaal) tavapäraste fluorstsentsi intensiivsusel põhinevate analoog signaalil põhinevate meetoditega nagu ELISA ja Luminex. Digitaalsed mõõtmised saadakse vaateväljas olevate fluorestsentsstappide lugemisega. Lahuse pesemine ei ole vajalik, kuna pinnasest kaugemal olevaid fluorofoore ei ergastata ja need ei sega üksikmolekulide lugemist. Tulemused näitasid, et üksikmolekul-süsteemid, mis võimaldavad antikehade kõrget lahutusega vaatlust, võimaldavad tundlikumat tuvastamist, kui analoog signaalil põhinevad süsteemid. Üksikmolekulide tasemel saadi lahjade lahuste korral tuhat korda kõrgem tundlikus kui analoogi puhul, nagu selleks on ELISA (Tessler ja Mirta, 2011).

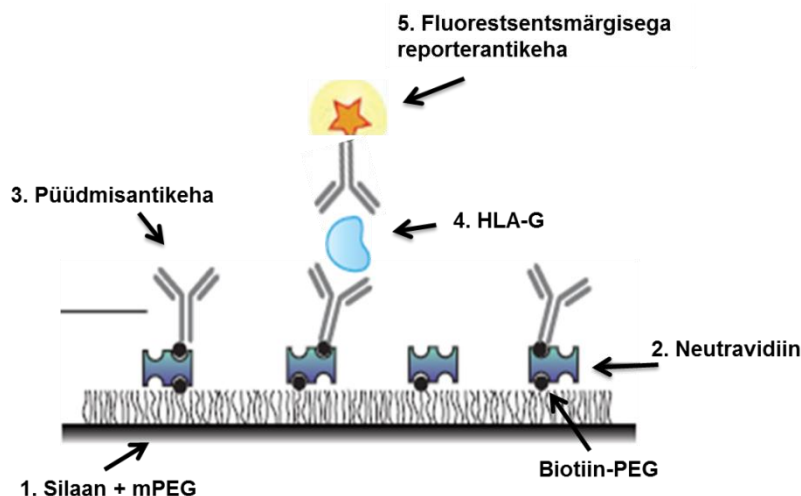
1.5.1 TIRF biosensori ehitus

Valkude tuvastamiseks mõeldud TIRF biosensori ülesehitus on sarnane ELISA-le. Põhiline aspekt selle meetodid puhul on meid huvitava valgu selektiivne immobiliseerimine. Püüdmissantikeha püüdev pind peab spetsiifiliselt siduma määratavat valku, vähendades mittespetsiifilist adsorptsiooni. See saavutatakse passiveerides klaase PEG (polüetüleen glükool)-iga. On näidatud, et PEG sobib valkude vastu pinna passiveerimiseks paremini kui BSA, mis on kasutatud tüüpiliselt ELISA puhul. Kui klaasi pinnale on moodustunud tihe PEG kiht moodustab see polümeerse harja, mis vähendab oluliselt valkude seondumist klaasi pinnale. Rasnik *et al.* poolt läbi viidud katses leiti, et PEG-kaetud pinna mittespetsiifiline adsorptsioon oli 1000x väiksem kui BSA-kaetud pinnal, mida kasutatakse nt ELISA puhul mittespetsiifilise sidumise vähendamiseks (Rasnik *et al.*, 2005). Passiveerimise kvaliteet on spetsiifilisuse tagamisel väga tähtis.

Klaaside ettevalmistamise ajal lisatakse ka biotinüleeritud PEG-i. See funktsionaliseerib pinna ja võimaldab biotinüleeritud biomolekulide spetsiifilist immobiliseerimist neutravidiiniga.

Uuritava valgu spetsiifiline püüdmine saavutatakse kasutades pinnale immobiliseeritud antikehasid. Biotiiniga kaetud pinnale lisatakse neutravidiini, mis omakorda püüab kinni biotinüleeritud püüdmissantikeha. Uuritava valgu püüab teiselt poolt kinni omakorda fluorestsentsmärgisega reporterantikeha, võimaldades tervet kompleksi TIRF mikroskoopi

kasutades visualiseerida (joonis 2). TIRF loob lühiajalise ergastusvalguse, mis ulatub ainult 200 nm kaugusele pinnast ja ergastab fluorofloore, mis asuvad pinnal. See vähendab märgatavalt tausta, mis võib tulla lahuses olevatelt fluoroflooridelt. (Jain *et al.*, 2012).



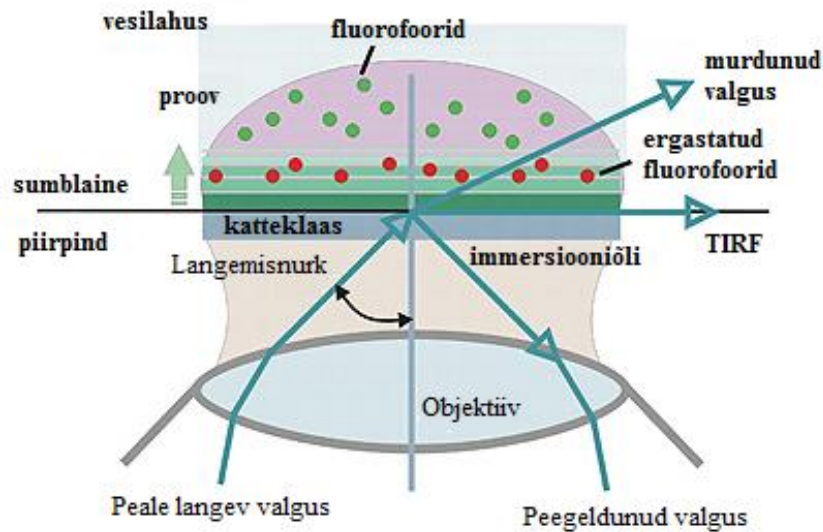
Joonis 2. TIRF mikroskoopia põhinev biosensor-süsteem. Plasma ja metanooliga puhastatud mikroskoobi klaas on passiveeritud silaani ja PEG-iga, mille hulgas on 2% biotinüleeritud PEG-i. Biotinüleeritud püüdmisantikehad valgu püüdmiseks immobiliseeritakse biotiin-neutravidiin interaktsiooni abil. Püüdmisantikeha seob uuritava valgu, mille teiselt poolt püüab kinni fluorestsentsmärgisega reporterantikeha (modifitseeritud – Jain *et al.*, 2012).

1.5.2 TIRF mikroskoobi ülesehitus

TIRF mikroskoopia on kõige levinum laivälja (wild-field) tuvastamise meetod üksikmolekulide rakendustes. TIRF mikroskoop võimaldab fluoroflooride selektiivset ergastamist vesi- ja rakukeskkonnas klaasi pinna lähedalt, kus toimub täielik sisepeegeldus, ilma, et ergastataks alasid väljaspool pinnakihti. Sügavus sõltub paljudest parameetritest – kõige olulisemad on uuritava pinna ja vedeliku refraktsiooni indeks, ergastava valguse lainepikkus ja ergastava valguse langemisnurk (ingl. k. *incident angle*). Fluoroflooride ergastamine tekitab vedelikus väga õhukese elektromagnetvälja (tavaliselt <200 nm), millel on ergastava valgusega sama sagedus. Kirjeldatud välja kutsutakse sumblaine (ingl. k. *evanescent wave*) ja selle intensiivsus kahaneb eksponentsiaalselt pinnakihist kaugenedes. See väli on võimeline ergastama fluorfoore pinna lähedal eirates lahuses suures osas olevate fluoroflooride ergastamist (joonis 3). Tänu sellele luuakse väga madala taustafluorestsentsiga pildid ja fookusest väljas olevat fluorestsentsi ei teki (Axelrod, 1981; Axelrod, 2001).

TIRF mikroskoop on sobilik pinna külge immobiliseeritud molekulide uurimiseks. Signaali tuvastamiseks kasutatakse CCD (laengsidestusseadis)-kaameraid mis võimaldavad

üheaegselt jälgida sadu üksikmolekule sub-millisekundilise ajalise lahutusega (Joo *et al.*, 2008).



Jooni 3. TIRF mikroskoobi lihtsustatud tööpõhimõte. Sumblaine intensiivsus kahaneb eksponentsiaalselt katteklaasist kaugenedes, seega on tema läbimissügavus piiratud ~200nm juurde. Sellisel viisil pinnasest kaugemal olevad fluorofloorid ei ergastu. Sumblaine tekib ainult siis, kui juhtvalgus muutub klaasi-vedeliku piirpinnal täielikult sisemiselt peegelduvaks. See juhtub kui juhtvalgus tabab klaasi-vee piirpinda kindla nurga all, mida nim. kriitiliseks nurgaks. Kui see nurk on võrdne, muutub selle refraktsiooni suund paralleelseks ühenduskohaga (täielikult sisemiselt peegeldunud); kriitilisest nurgast üleval pool peegeldub juhtvalgus täielikult. (<http://www.ncl.ac.uk/bioimaging/techniques/tirfm/> - modifitseeritud)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks oli välja töötada TIRF mikroskoopiaal põhinev biosensorsüsteem HLA-G määramiseks.

Ülesanne jaotati järgmisteks alametappideks:

1. Üksikute biomolekulide tuvastamise suutlikkuse näitamine
2. Parima klaasipuhastusmeetodi valimine
3. Klaaspinna funktsionaliseerimise tõhususe kontrollimine
 - a. Silaanimise/pegüleerimise efekti hindamine
 - b. Streptavidiini/Neutravidiini sidumise spetsiifilisus
 - c. Biotiini-streptavidiini sidumise spetsiifilisus
 - d. Antikehade mittespetsiifiline sidumine
 - e. Katsetingimuste optimeerimine
4. Püüdmisantikeha seondumise spetsiifilisuse näitamine
5. HLA-G sidumise katsed
6. HLA-G ja ELISA meetodi võrdlus

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Klaaside puhastamine

Klaaside puhastamisel kasutati alusena varem kirjanduses toodud Taekjip Ha grupi poolt (Jaen *et al.*, 2012) kirjeldatud protokoll, mida kohandati vastavalt meie süsteemile.

Katteklaase (Marienfeld High Percision; 22x22mm) loputati nii destilleeritud vee kui ka MQ-ga. Loputatud klaase sonikeeriti ultrahelivannis (WiseClean) algselt 15 minutit MQ-s, hiljem 15 minutit metanoolis (Naxo). Klaase kuivatati 5 minutit plasma puhastis (ATTO Plasma Cleaner, Diener Electronics) oleva vaakumiga ja vähendamaks pinnal olevat orgaanilist mustust puhastati 15 minutit 200W plasma juures.

2.2.2 Silaanimine

Silaanimisel kasutati 0.6 mL 97% aminosilaani (N-[3-Trimetoksüsilüül]propüül]etüleendiamiin) (Sigma Aldrich) ja 3 mL 99.5 % atsetaadi lahust (Naxo) 57 mL metanoolis. Saadud segu valati koheselt peale klaastopides asuvatele klaasidele. Klaase inkubeeriti 10 minutit, sonikeeriti 1 minut ja inkubeeriti uuesti 10 minutit. Silaanimireaktsioon peatati tõstes klaasid metanooliga täidetud topsi ~ 10 minutiks. 10 minuti mööduses lisati klaasid ~ 10 minutiks uude metanooliga täidetud topsi. Klaase kuivatati 3 minutit vaakumkambris (Millipore), seejärel lasti klaasidele peale argoon ning hoiti klaase topsis kuni pegüleerimiseni.

2.2.3 Klaaside pegüleerimine ja funktsionaliseerimine

PEG lahuse valmistamiseks suspendeeriti 8.4 mg NaHCO_3 1 ml MQ-s, pH 8.5. mPEG/bPEG lahuse valmistamiseks 8 klaasi jaoks suspendeeriti 40 mg metoksü-PEG (Irish Biotech) ja 0.75 mg biotiin-PEG (Irish Biotech) 175 μL -s NaHCO_3 . Lahus tsentrifuugiti Elmi lauatsentrifuugiga mullide eemaldamiseks 1 minut 7200 g juures. 35 μL segu lisati kohe igale alusklaasile (4 tk), mis kaeti katteklaasiga. Klaase inkubeeriti PEG-i lahuses üleöö toatemperatuuril pimedas niiskes keskkonnas. Järgmisel päeval eemaldati alus- ja katteklaasid teineteisest, loputati ükshaaval rohke MQ-ga, kuivatati lämmastikuga, dehüdreeriti 10 min vaakumiga ja suleti klaastopsi argooni keskkonnas edasisesks hoiustamiseks. Klaase säilitati -20°C juures, maksimaalselt 2-3 nädalat.

2.2.4 TIRF mikroskoobi parameetrid

HLA-G üksikomekule tuvastati TIRF mikroskoobiga (iMIC, Till Photonics GmbH). Eksiteeriva valgusallikana kasutati Cobolt Dual Calypso™ 491/532 nm DPSS (ingl. k. diode-pumped solid-state) laserit (50 mW), mille kiirgusest selekteeriti AOTF-ga (ingl. k. acousto optical tunable filter) (AOTFnC-400.650-TN, AA-Opoelectronics) 532 nm lainepikkus. Läbi Zt 532 rdcxt dikromaatse peegli (Semrock) suunati valgus 60x õli APON TIRF objektiivile (NA, numerical aperture 1,49) (Olympus). Laserkiire langemisnurka varieeriti Yanus II skaneerimisseadme abil (Till Photonics GmbH). Objektiivist tulev valgus filtreeriti läbi ET 605±35 (Chroma). Detekteerimiseks kasutati iXON 885 EMCCD kaamerat (Andor).

Üksikmolekulide loendamine teostati vabavara programmiga ImageJ v1.44p. Tulemuste statistilisel analüüsil ja graafilisel esitamisel kasutati andmetöötlusprogrammi GraphPad PrismTM 5.00 (GraphPad Software Inc.).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

TIRF biosensori ülesehitus põhineb klassikalisel „sandwich“ ELISA-l. Tuvastatav analüüt, HLA-G, püütakse funktsionaliseeritud pinnale (antud sensori puhul klaasist slaidile) pinna külge seondunud püüdmisantikeha abil ja signaal tuvastatakse märgistatud sekundaarse reporterantikehaga. Mõlemad antikehad seovad sama antigeeni erinevaid epitoope. Erinevalt ELISA-st, kus signaali mõõdetakse ensüümi substraadi reageerimisel ensüümiga põhjustatud värvimuutuse intensiivsuse järgi (Berg *et al.*, 2002), kasutakse antud sensori puhul fluorestsentsmärgiseid. Märgiseid vaadeldakse TIRF mikroskoobiga, mis võimaldab fluorofooride selektiivset ergastamist vesi-keskkonnas klaasi pinna lähedalt (200 nm), kus toimub täielik sisepeegeldus, ilma, et ergastataks alasid väljaspool pinnakihti (Axelrod, 2001). Sedasi on võimalik üksikmolekulide signaali digitaalselt tuvastada, mis vähendab märgatavalt taustasignaali ja suurendab avastamisspiiri.

Et selline sensorsüsteem töötaks kui tervik, on vajalik, et iga üksik etapp alates klaasist lõpetades reporterantikehaga töötaks eraldiseisvalt. Ühelt poolt peavad olema tagatud sensorsüsteemi erinevate komponentide spetsiifilised interaktsioonid, et HLA-G molekul võimalikult spetsiifiliselt pinnale püüda. Teiselt poolt peab olema tagatud minimaalne reporterantikeha mittespetsiifiline, HLA-G-st sõltumatu, pinnale kinnitumine.

3.1 Funktsionaliseeritud sensorklaaside valmistamine

Üksikmolekulide visualiseerimiseks TIRF-iga ja hiljem nende analüüsimiseks peavad need olema klaasi pinnale immobiliseeritud. Klaasipind ei võimalda aga analüüdi selektiivset kinnitumist. Immobiliseerimiseks on tarvis funktsionaalseid saite, mis võimaldaksid molekulide kontrollitud immobilisatsiooni. Klaaspinda on võimalik funktsionaliseerida silaanimise ja pegüleerimise teel (Piehler *et al.*, 2000). Antud töös kasutatakse funktsionaalsete saitidena biotiini. Tundlikkuse saavutamiseks on aga vajalik, et ülejäänud pinnast oleks mittespetsiifilise sidumise vältimiseks passiveeritud.

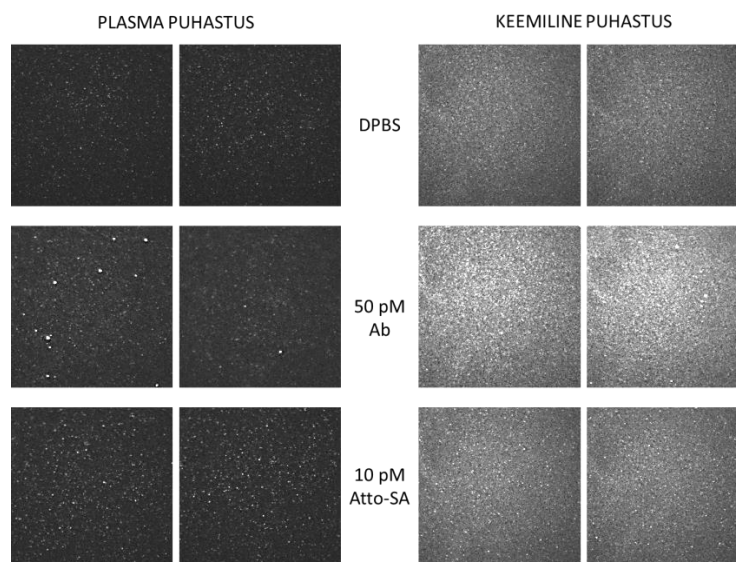
3.1.1 Üksikmolekulid funktsionaliseeritud klaasil

Üritamaks tuvastada üksikmolekule võtsime aluseks kirjanduses toodud protokoll (Jain *et al.*, 2012), mille abil oli varasemalt saavutatud funktsionaliseeritud ehk biotinüleeritud klaasil üksikmolekulide tundlikkus. Korrates antud protokoll suudeti samuti üksikmolekule

tuvastada, aga tulemused ei olnud alati reprodutseeritavad – esines ebahomogeenset sidumist ja kõrget taustamüra.

3.1.1.1 Puhastusmeetodite võrdlus

Uurimaks, kas erinevatel puhastusmeetoditel võiks olla erinev mõju taustamürale, testiti funktsionaliseeritud klaase kahel eri meetodil: õhuplasma puhastust koos metanooli puhastusega ja ainult keemilist puhastust. Eelnevalt oli Sergei Kopantšuk'i poolt läbi sõelatud eri tootjate klaasid, et leida selline, mille pinnaühtlus oleks võimalikult hea. Õhuplasma puhastus koos metanooli puhastusega peaks teoorias andma puhtama pinna, kuna plasma on võimeline eemaldama klaaside pinnalt orgaanilise mustuse (Gun *et al.*, 2008). Tulemustes nähtus, et juhul kui kõik parameetrid on samad, annab keemiline puhastamine tunduvalt kõrgema taustafluorestsentsi (joonis 4b), kui plasma puhastus (joonis 4a). Samuti andis keemiline puhastus võrreldes plasma puhastusega fluoroflooride (W6/32-PE, Atto-532-streptavidiin) lisamisel kõrge taustafluorestsentsi (joonis 3c,d,e,f), mis segas täppide edasist analüüsimist. Lisaks on plasmaga puhastus oluline klaasi pinnal olevate OH-gruppide aktiveerimiseks, mis on omakorda oluline silaanimiseks (Gell *et al.*, 2010).



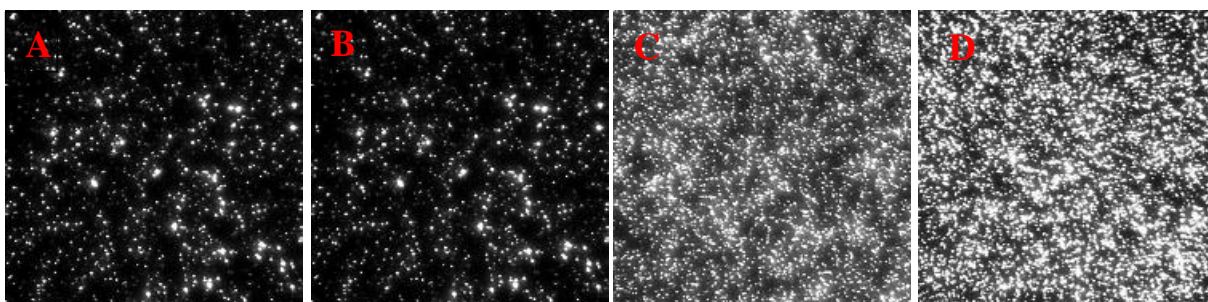
Joonis 4. Plasma ja keemilise puhastuse võrdlus funktsionaliseeritud klaasidel. Spetsiifilise sidumise mõõtmiseks lisati 10 pM Atto-532-streptavidiini (SA) ja mittespetsiifilise sidumise mõõtmiseks 50 pM W6/32-PE-d (Ab). Taustafluorestsentsi hindamiseks lisati DPBS-i. Kõiki aineid inkubeeriti 30 minutit.

3.1.2 Mittespetsiifiline sidumine puhastatud klaasil

Uurimaks pinna passiveerimise olulisust ja kohatist kõrge ning varieeruva mittespetsiifilise sidumise põhjust, viidi läbi katsed plasma ja metanooliga puhastatud, kuid funktsionaliseerimata klaasil, kuhu lisati vastavalt kas püüdmisantikeha (dAb, W6/32-PE) (Exbio, Praha), streptavidiin-fükoerütriini (SA-PE) (Sigma Aldrich) või ülehulgas märgistamata streptavidiini (SA) (ProSbec).

Hästi funktsionaliseeritud klaasi korral peaks SA-PE suure afiinsusega spetsiifiliselt biotiini külge seonduma ja dAb seondumine peaks olema oluliselt väiksem, kuna ei interakteeru spetsiifiliselt biotinüleeritud pinnaga. Ülehulgas SA lisamine peaks enamuse seondumissaidid blokeerima ja SA-PE seondumist vähendama.

Puhastatud klaasi puhul ei tohiks eeldatavalt esineda mingit spetsiifilist sidumist, mis nähtus ka saadud tulemustest. Puhastatud klaas seondas enda külge nii SA-PE kui ka dAb (joonis 5a,c), eriti aga dAb-d (joonis 5c,d). Sidumist ei vähendanud ka see, kui enne SA-PE ja dAB lisamist oli sidumissaitide blokeerimiseks lisatud ülehulgas SA-d (joonis 5b,c). Seetõttu on oluline klaasi edasine passiveerimine ja funktsioniseerimine.



Joonis 5. Puhastatud klaas dAb, SA ja SA-PE lisamisel. Plasma ja metanooliga puhastatud klaasile lisati mittespetsiifilise sidumise kindlakstegemiseks: A – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; B – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; C – klaasi inkubeeriti 30 minutit dAb-ga; D – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit dAB-ga.

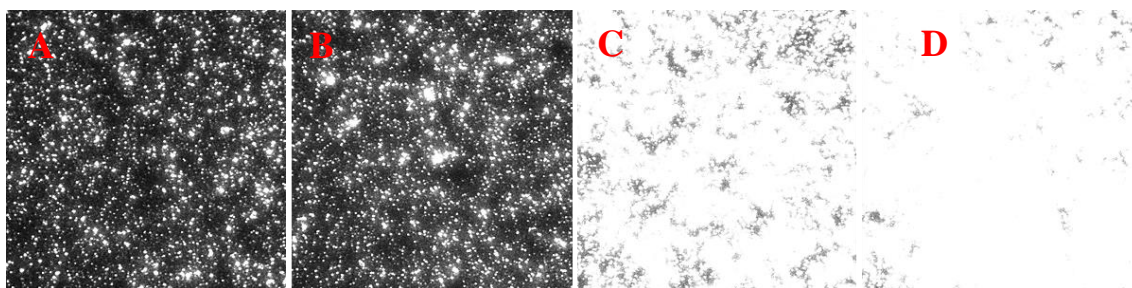
3.1.3 Mittespetsiifiline sidumine silaniseeritud klaasil

Kuigi klaaspinnad ei võimalda selektiivset monokihtide kovalentset sidumist, on neid võimalik keemiliselt silaanimise teel modifitseerida. Sobivaid funktsionaalrühmi sisaldavate hüdfoobsete alküülsilaanidega eeltöötlus on üks meetoditest, mida kasutatakse molekulide kovalentseks sidumiseks (Arslan, 2006). Et saavutada ühtlane silaanimine on vajalik puhastatud, madala taustafluorestsentsiga klaasipind, mis oleks vaba igasugusest mustusest.

Oluline on ka klaasipinnal olevate OH-gruppide aktiveerimine. See saavutati eelnevalt plasma ja metanooli töötusega (Festag *et al.*, 2005; Gell *et al.*, 2010).

Klaasipindade töötlemisel tiheda silaaniga võivad tekkida aga oligomeerid, millega peab arvestama, kui kasutakse funktsionaalrühmi sisaldavaid silaane. Seega on silaniseeritud pinnad tihti hüdrofoobsed, põhjustades väga suurt mittespetsiifilist sidumist (Piehler *et al.*, 2000). Selle kontrollimiseks tehti katse, kus silaanitud klaasile lisati kas dAb-d, SA-PE-t või ülehulgas SA-d. Sarnaselt puhastatud klaasile (joonis 6) oli mittespetsiifiline sidumine väga suur, eriti dAb puhul, kuna puuduvad sidumiseks vajalikud biotiini rühmad. Ka ülehulgas SA lisamine ei suutnud pinda piisavalt blokeerida ja mittespetsiifilist sidumist vähendada.

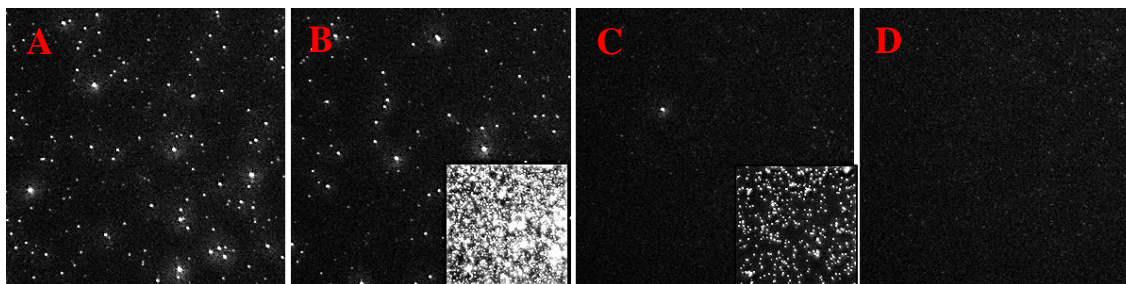
Antud tulemuste põhjal võib järeldada, et defektide korral klaasi passiveerimisprotsessis ja avatud silaanipinna olemasolul on oodata väga suurt mittespetsiifilist sidumist.



Joonis 6. Puhastatud silaanitud klaas SA, SA-PE ja dAb korral. Plasma ja metanooliga puhastatud ja silaanitud klaas mittespetsiifilise sidumise kindlakstegemiseks. A – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; B – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; C – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM dAb-ga ja D – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM dAb-ga.

3.1.4 Mittespetsiifiline sidumine passiveeritud klaasil

Silaanimisest tulevat hüdrofoobset sidumist saab vähendada lisades hüdrofiilsest polümeerist koosneva kihi. Üheks selliseks polümeeriks on polüetüleenglükool (PEG), millel on valke hülgevad omadused. Seega peaks PEG-i kiht olema võimeline vähendama valkude mittespetsiifilist sidumist (Piehler *et al.*, 2000; Rasnik *et al.*, 2005). Selleks viidi läbi katse, kus metoksü-PEG (mPEG) kihiga kaetud klaasile, mis oli eelnevalt silaanitud, lisati kas dAb-d, SA-PE-t või ülehulgas SA-d. Tulemustest selgub, et mPEG töötab ja on oluline mittespetsiifilise sidumise vältimiseks, kuna dAb andis väga madala signaali (joonis 7c,d). mPEG kiht ei ole aga alati ühtlane; augud mPEG kihis (joonis 7 b,c) viitavad klaasi/silaani pinnal mittespetsiifilisele sidumisele. Erinevalt puhastatud (joonis 5) ja silaanitud (joonis 6) klaasidest blokeeritakse siin dAb-d rohkem kui SA-d. See ei ole aga antud sensori puhul probleemiks, kuna eesmärgiks on antikehade blokeerimine.



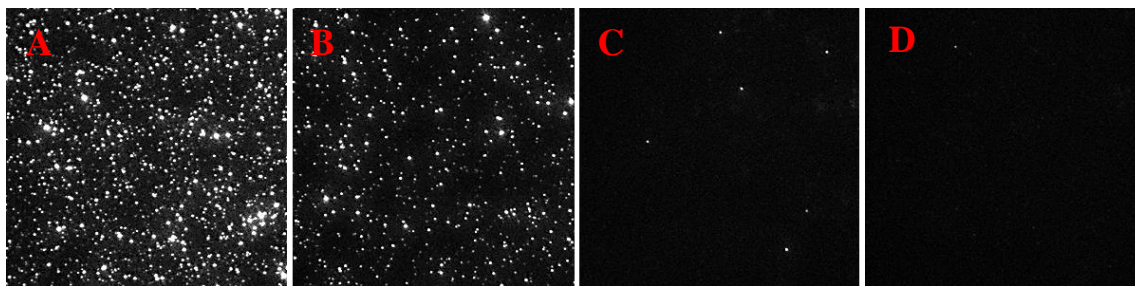
Joonis 7. Puhastatud passiveeritud klaas SA, SA-PE ja dAb korral. Plasma ja metanooliga puhastatud, silaanitud ja mPEG-iga kaetud klaas. A – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; B – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM SA-PE-ga; C – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM dAb-ga ja D – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM dAb-ga.

3.1.5 Spetsiifiline sidumine funktsionaliseeritud klaasil

Kuna selgus, et mPEG on võimeline klaasikihti passiveerima oli edasiseks vajalik pinna funktsionaliseerimine, et toimuks antikehade spetsiifiline immobiliseerimine pinnale. Selleks lisati väike osa (~2%) PEG polümeere, mille otsad on modifitseeritud biotiiniga (bPEG) (Jain *et al.*, 2012). Viidi läbi ülemistele katsetele sarnane katse. SA-PE seondub spetsiifiliselt ainult sinna, kus asub bPEG, ülejäänud pind on mPEG-i poolt passiveeritud (joonis 8a).

Streptavidiini-biotiini ühenduse kasutamine on üks kõige tavalisemaid meetodeid biotinüleeritud antikehade sidumiseks (Ahmed *et al.*, 2014). Seda ühendust iseloomustab kõrge, femtomolaarne afiinsus ja hea reaktsiooni spetsiifilisus (Hu *et al.*, 2013). Inkubeerides pinda enne SA-PE lisamist ülehulgas märgistamata SA-ga, peaks SA-PE olema võimeline seonduma ainult vabadele biotiini molekulidele, mida nähtus ka saadud tulemusest. SA lisamisel vähenes SA-PE arv võrreldes ainult SA-PE lisamisega (joonis 8b). Kuna teoorias ootaks aga veelgi suuremat blokeerimist, otsustati testida streptavidiini analoogi, neutravidiini (joonis 9). Neutravidiin, nagu streptavidiin, seondub spetsiifiliselt biotiiniga, aga talle on omistatud madalam mittespetsiifiline sidumine (Nguyen *et al.*, 2012).

Tulemusest nähtus ka, et dAb sidumine on väga väike, mida oli oodata, kuna ta ei interakteeru spetsiifiliselt biotiiniga (joonis 8c,d). Samuti blokeerib dAb-d mPEG kiht.



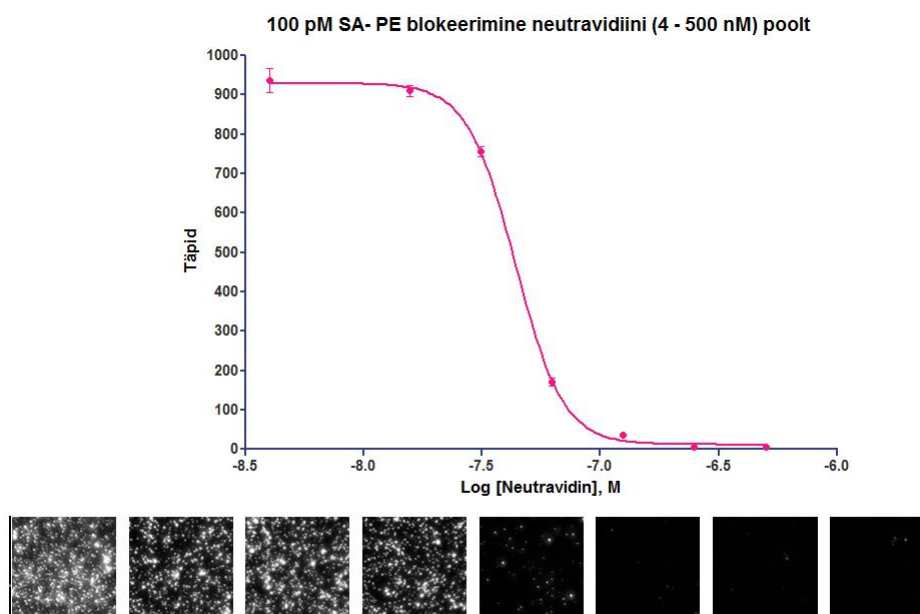
Joonis 8. Funktsionaliseeritud klaas SA, SA-PE ja märgistamata SA korral. Plasmaga ja metanooliga töödeldud, silaanitud, passiveeritud ja 2% bPEG kihiga kaetud klaasile. A – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM SA-PE-ga (spetsiifiline sidumine); B – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM SA-PE-ga (spetsiifiline sidumine ja spetsiifiline blokeerimine); C – klaasi inkubeeriti 30 minutit 50 pM dAb-ga (mittespetsiifiline sidumine) ja D – klaasi inkubeeriti 30 minutit 1 μ M SA ja 30 minutit 50 pM dAb-ga (mittespetsiifiline blokeerimine).

3.2 Neutravidini (NA) spetsiifiline sidumine pinnale

Otsustamaks, millist neutravidini kontsentratsiooni edasistes katsetes kasutada ja kontrollimaks SA-PE sidumise spetsiifilisust, uuriti millal toimub mPEG/bPEG-i täielik küllastumine. Selleks testiti, kui palju seostub SA-PE-t pinnale, kui eelnevalt on ülehulgas (4 – 500 nM) lisatud märgistamata neutravidini (NA).

Tulemustest selgub, et NA seondub spetsiifiliselt pinnale. Mida rohkem oli lisatud märgistamata NA-d, seda rohkem olid sidumissaidid blokeeritud ja seda vähem sai SA-PE seonduda. Juba 100 nM NA on võimeline blokeerima enamus sidumissaitidest. Blokeerimine oli suurem ka eelpool mainitud SA katsetest (joonis 8). Võib oletada, et varasemalt kasutatud SA oli kas tootja poolt märgitust väiksema kontsentratsiooniga või esines mitteaktiivsel kujul.

Saadud tulemusest lähtudes võeti edaspidi kasutusele varasematest katsetest madalamad NA ja ka püüdmisantikeha kontsentratsioonid.



Joonis 9. SA-PE blokeerimine märgistamata NA poolt. Klaasi inkubeeriti 25 minutit märgistamata NA-ga (kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 4 – 500 nM lõpplahuses; 2x kontsentratsiooni tõus). 25 minuti inkubatsiooniaja järgselt lisati kõikidesse süvenditesse 200 pM SA-PE-t (lõppkontsentratsioon 100 pM). Klaasi vaadeldi 25 minutilise inkubatsiooni järgselt.

3.3 Biotiin-streptavidiin-biotiin interaktsiooni uurimine

Funktsionaliseeritud biotiin peaks ühelt poolt seondama spetsiifiliselt streptavidiini (SA) ja teiselt poolt peaks SA seondama biotiiniga modifitseeritud antikeha. Kontrollimaks, kas pinnale seondunud SA ja biotiini vahel toimub spetsiifiline seostumine lisati klaasile vastavalt kas märgistatud biotiini (Fitc-biotiin, F-BT), märgistamata NA-d või märgistamata biotiini (BT). Tulemustest nähtub, et kui lisada klaasile F-BT-ni, ei esine suurt sidumist, mida oli ka oodata, kuna puudub SA, kuhu külge biotiin saaks seonduda (joonis 10a). SA-d lisamisel oli näha aga suurenenud sidumist, mis näitab, et biotiin seodub spetsiifiliselt SA külge (joonis 10b). Ülehulgas märgistamata BT lisamisel on sidumine väiksem (joonis 10b), sest kõik streptavidiini biotiini sidumissaidid on märgistamata BA poolt ära blokeeritud.

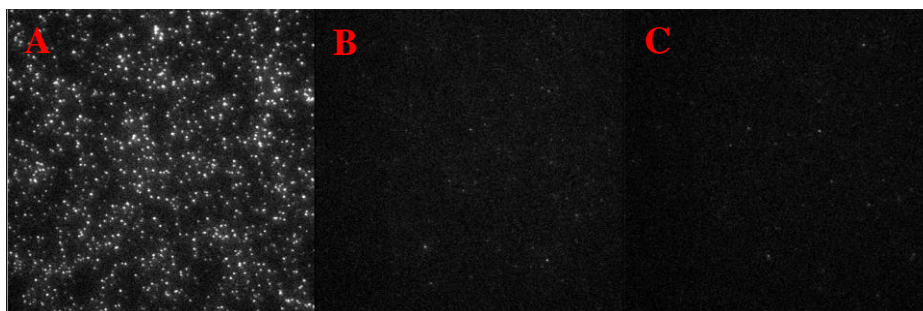


Joonis10. Streptavidiin-biotiin interaktsioon. Funktsionaliseeritud klaas. A – klaasi inkubeeriti 25 minutit F-BT-ga; B – klaasi inkubeeriti 25 minutit 1 μ M SA, 25 minutit 3 μ M BT ja 33 nM F-BT-ga ja C – klaasi inkubeeriti 25 minutit 1 μ M SA ja 25 minutit 33 nM F-BT-ga.

3.4 Püüdmisantikeha MEM-G/9 spetsiifiline sidumine pinnale

Antud katsete puhul on püüdmisantikehana kasutatud biotiin-MEM-G/9-t (cAb) ja reporterantikehana W6/32-PE-d (dAb). On näidatud, et see antikehade paar on sHLA-G tuvastamiseks kõige spetsiifilisem, eriti kui on oht ristreaktiivuseks teiste HLA klass I molekulidega, kuna MEM-G/9 tunneb ära ainult β 2-mikroglobuliiniga seostunud (HLA-G1 ja HLA-G5) isovorme (Sageshima, *et al.*, 2007).

Kontrollimaks, kas biotiin-MEMG-/9 seondub spetsiifiliselt funktsionaliseeritud pinnale lisati kas cAb-d, SA-d või mõlemat korraga. Tulemustest võib järeldada, et biotiin-MEM-G/9 tõesti seondub spetsiifiliselt pinnale. Biotiin-MEM-G/9-ga peaks seondumist näha olema ainult siis, kui on olemas streptavidiin kuhu biotiin saaks spetsiifiliselt seonduda (joonis 11 a). Juhul kui puudus kas biotiin-MEM-G/9 või SA, ei olnud sidumist näha, mida oli ka oodata (joonis 11b,c).



Joonis 11. Funktsioanliseeritud klaas NA, cAb ja daB sidumise korral. A - Klaasi inkubeeriti 25 minutit 19 nM NA, 9.5 nM MEM-G/9 ja 50 pM anti-mouse-Alexa488-ga. B – Klaasi inkubeeritu NA ja anti-mouse-alexa. C – Klaasi inkubeeriti bitoiin-MEM-G/9 ja anti-mouse-Alexa488-ga.

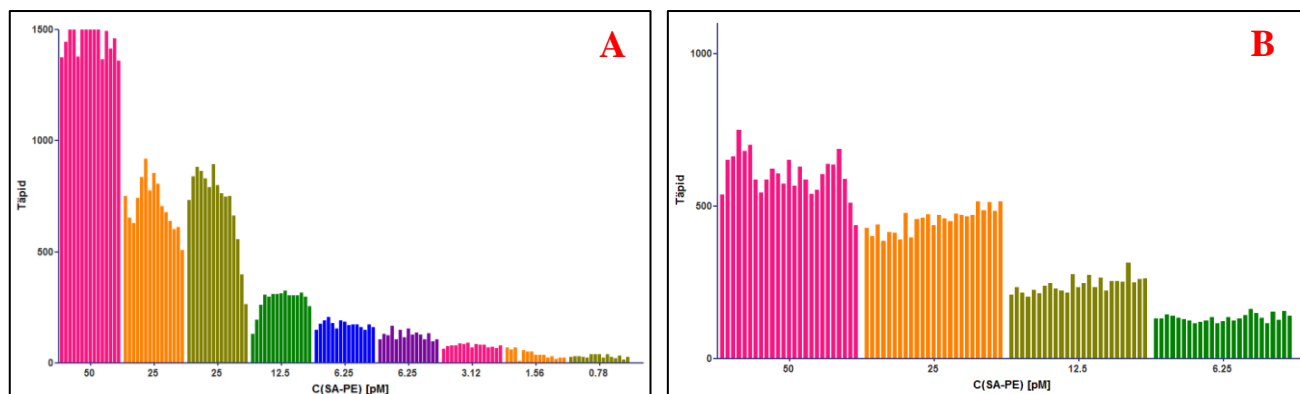
3.5 SA-PE sidumise optimeerimine

Katsete tegemisel kasutati algselt 64 süvendiga FlexWell tihendit, millest lõigati välja 9 süvendit hõlmav osa. Saadud 9 süvendiga tihendit oli võimalik asetada toetuseks 1 Well Chamblide CMS kambri (Live Cell Instrument) alusplaadile, vältimaks lekkeid. Samuti oli mikroskoobi parameetreid arvestades võimalik korraga jälgida ainult 9 süvendit. Kuna 9 süvendiga FlexWell kambri eeliseks on võimalus kasutada väga väikeseid lahuse koguseid (15 µl), otsustati uurida, kas sel võib olla katsesüsteemile ka negatiivne efekt. Selleks uuriti, kui ühtlane on SA-PE seostumine süvendisiseselt ja süvendite vahel, kasutades kontsentratsiooni sõltuvuse ja täppide arvu suhet. Samal ajal uuriti kas pluroonhappe (Pluronic F-127, Sigma) lisamine mõjutab katsetulemusi. Pluroonhappe on pindaktiivne aine, mis vähendab aggregeerumist ja ainete seostumist süvendi seinte külge.

Ilma pluroonhappe kasutamiseta on SA-PE seostumise varieeruvus väga suur (joonis 12). Pluroonhappe lisamine tõstis märgatavalt tuvastatvate täppide arvu ja aitas varieeruvust vähendada. Siiski esines nähtus, kus kambri äärtes oli täppide arv erinev kui keskel ja ei suudetud saada ühtlast signaali (joonis 12a). Kuna signaali homogeensus on antud sensori puhul oluline otsustati pluroonhapet ka edaspidi kasutada, aga FlexWell kambri (15 µl süvendiga) asemel testiti IBIDI silikoonkambit (100 µl süvendiga).

Ibidi algsest 12 süvendiga kambrist (*12 well removable cultivation chamber*) lõigati 4 süvendiga kambrid, mida oli võimalik asetada Chamblide CMS kambri alusele. Leiti, et kui Ibidi süvendiga silikoonkambri karkass asetada alusplaadile, annab see stabiilse toetustasapinna, vähendades lekete ohtu. Kuigi Ibidi kambris saab antud hetkel vaadelda ainult nelja süvendit ja vajalik on suurema proovi ruumala kasutamine, aitas kambri suurem pindala parema difundeerumise tõttu sidumise homogeensusust rahuldavale tasemele tõsta (joonis 12b). Samuti oli kambri FlexWell kambri omadest paksemad, vähendades lekke ohtu veelgi.

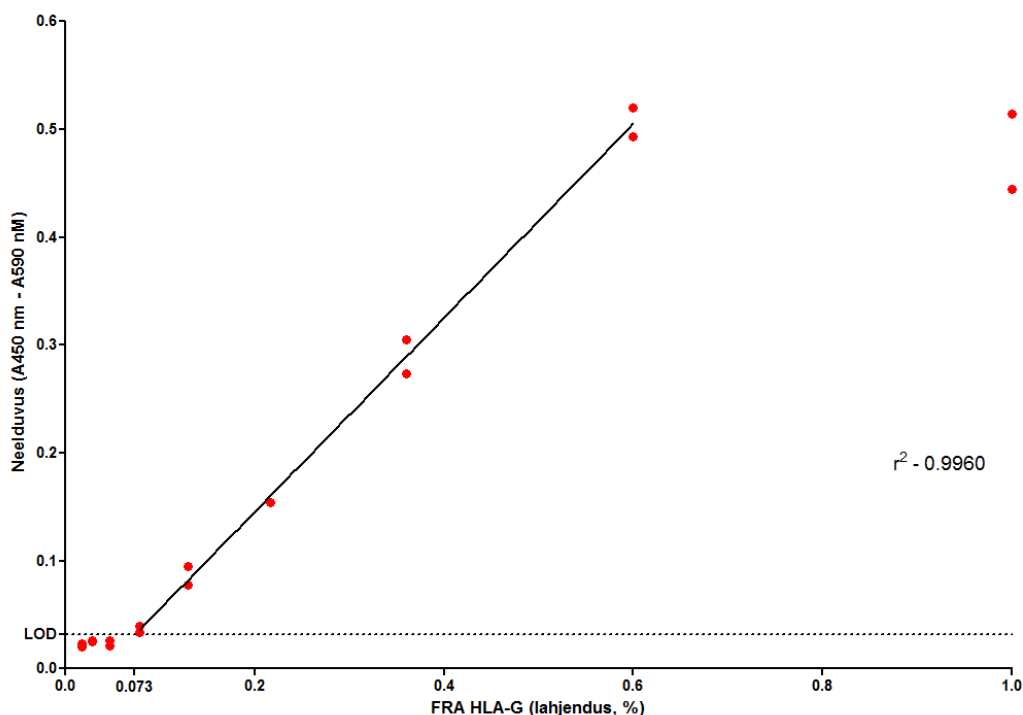
Nende tulemuste põhjal otsustati kõik edasised katsed viia läbi kasutades Ibidi kambrit. Tulevikus on võimalik mikroskoobi parameetreid muutes ja pikemat alusplaati kasutades korraga vaadelda ka 12-süvendiga kambreid.



Joonis 12. SA-PE sidumine FlexWell või Ibidi kambris erinevate kontsentratsioonide juures ilma ja koos pluronicuga. A - FlexWell kamber, ilma pluroonhappeta DPBS. Klaasi inkubeeriti 40 minutit SA-PE-ga varieerides kontsentrantsiooni vahemikus 0.78 – 50 pM. Valitud punktid (25 ja 6.25 pM) tehti duplikaatidena. B – FlexWell kamber, pluroonhappeta DPBS. Klaasi inkubeeriti 40 minutit SA-PE-ga varieerides kontsentrantsiooni vahemikus 0.78 – 50 pM. Valitud punktid (25 ja 6.25 pM) tehti duplikaatidena. C – Ibidi kamber, pluronhappeta DPBS. Klaasi inkubeeriti 40 minutit SA-PE-ga varieerides kontsentrantsiooni vahemikus 6.25 – 50 pM.

3.6 ELISA

Kuna antud töö eesmärgiks oli võrrelda HLA-G määramise standardmeetodid, ELISA-t, antud biosensoriga, teostativõrdluskatsed antud hetkel kommertsiaalselt kättesaadava ja mitmes teiste uurimisgruppide poolt kasutatava sHLA-G ELISA testiga (Exbio) (Shaikly *et al.*, 2008; Roussev *et al.*, 2007). Analüüdina kasutati Dr. Joel Lamaoult (Institut Universitaire d'Hematologie, Pariis, Prantsusmaa) saadud HLA-G preparaate, kuna neid oli võimalik hankida märkimisväärselt suuremates kogustes kui seda on kaasas Exbio kit-i standardlahuste näol, võimaldades samu preparaate kasutada ka väljatöötatava biosensori katsetes. Exbio kit-i avastamispiiriks saadi ligikaudu 0.07-0.08%. HLA-G kontsentratsiooni väljendatakse antud töös laheendusprotsendina alglahusest, kuna HLA-G täpne kontsentratsioon ei ole teada. Täpset kontsentratsiooni ei ole võimalik ka Exbio standardlahusega võrreldes saada, kuna neid avaldatakse ja väljendatakse vaid antud tootjale spetsiifilistes ühikutes (U/ml), mida ei ole konkreetsete kontsentratsiooniga seotud.

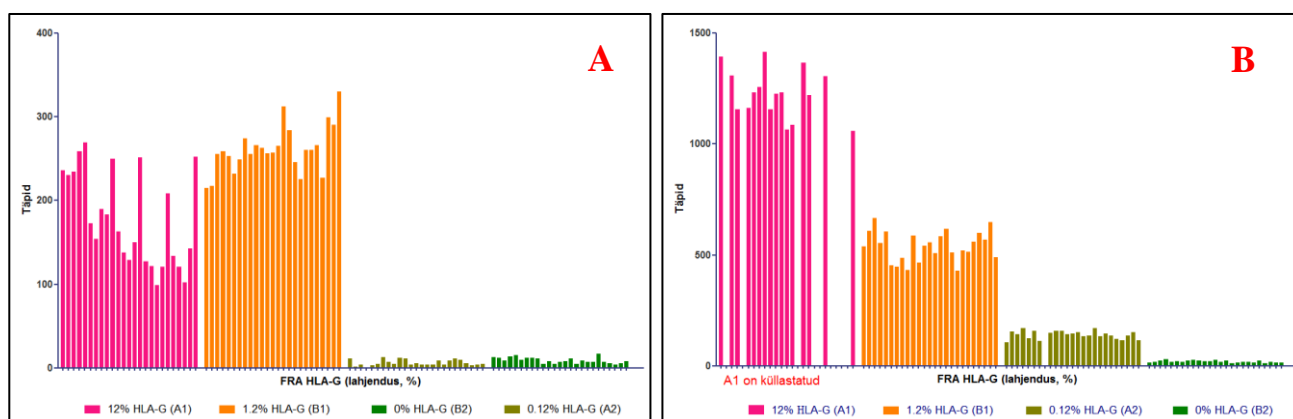


Joonis 13. Exbio sHLA-G ELISA test. Katse teostati standardprotokolli järgi. FRA HLA-G – HLA-G kontsentratsioon, väljendatuna alglahuse lahjendusprotsendina. Avastamiskiir (LOD) on analüüdi kontsentratsioon, mis annab kõrgema neelduvuse kui kontrolllahuste keskmine neelduvus, pluss 3-kordne standardhälve sellest.

3.7 HLA-G „võileiva“ optimeerimine

Olles teostanud ELISA ja kindlaks teinud, et MEM-G/9 seondub spetsiifiliselt pinnale, viidi läbi HLA-G „võileiva“ katse, kuhu lisati nii HLA-G-d kui ka sAb-d. Algselt testiti, kuidas „võileib“ töötab, kui vahepealse etapina ei pestud cAb-d ja NA süvendist ära. Tulemustest on näha, et kuigi kasutasime pluroonhapet ei esine kontsentratsiooni sõltuvust (joonis 13a). Tulemustest võib järeldada, et ilma vahepealse pesemiseta „võileib“ ei anna soovitud tulemusi ja vajalik on testida vahepealse pesemisetapi mõju. Vahepealne dAb ja NA pesemine aitas märgatavalt tulemusi mõjutada, mis väljendus ühtlases kontsentratsiooni languses (joonis 14b). Võib oletada, et vahepealse pesemisega eemaldati lahtine cAb, mis ei olnud pinnale seostunud ja võis osa HLA-G-d lahusest ära püüda. Pinnale püüdmist võib takistada kas seondumissaitide vähesus või olukord, kus osadel antikehadel puudub seondumiseks vajalik biotiinrühm. Erinevalt ELISA-st ei pea dAb-d pesema, kuna pinnast eemalolevaid fluorofloore ei ergastata. See tagab, et reporterantikeha on lahuses alati olemas ja teda ei pesta välja. See aitab vältida HLA-G molekulide väljapesemist, mida on proovis väga

vähe ja mille tundlikku määramist soovitatakse saavutada. Eeliseks ELISA ees on ka see, et kahe päevase testimise asemel saab antud „võileiva“ katset läbi viia ligikaudu 6 tunni jooksul.

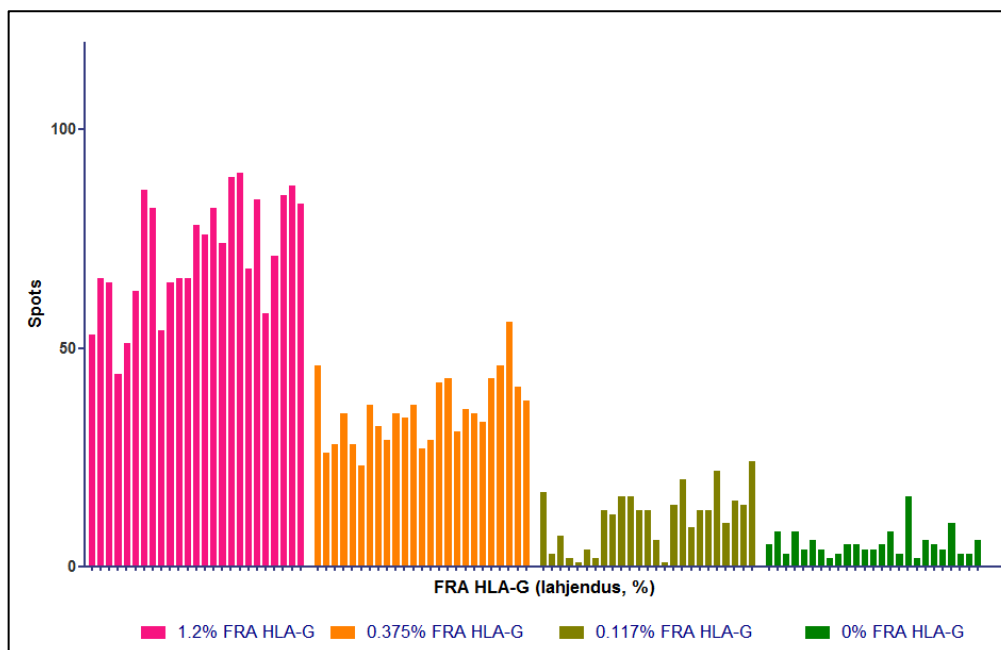


Joonis 14. HLA-G „võileib“ Ibidi kambris koos pluronicuga, ilma pesemiseta ja vahepealse pesemisetapiga. 30 minutiliste inkubeerimise etappidena lisati 19 nM NA-d; 9.5 nM Biotiin-MEM-G/9-t; 12%, 1,2% ja 0.12% HLA-G alglahuse lahjendust ja 50 pM W6/32-te. Pesu teostati peale MEM-G/9 pooletunnist inkubeerimist. Negatiivse kontrollina kasutati DPBS-i.

3.7.1 HLA-G kontsentratsiooni vähendamine

Kuna suutsime HLA-G „võileiva“ puhul tagada homogeensuse ja kontsentratsiooni sõltuvuse oli järgmiseks eesmärgiks kontsentratsiooni vähendamine ehk määramispiiri selgitamine. Kuna HLA-G täpne kontsentratsioon on teadmata, on kontsentratsioone märgistanud alglahuse lahjendusprotsendina. Töö käigus arendati välja meetod, mille tundlikkus võrreldes ELISA-ga jääb samasse suurusjärku (joonis 15).

Kuna antud hetkel on veel probleemiks mittespetsiifiline sidumine oleks klaaside ühtlasemal passiveerimisel ja funktsionaliseerimisel teoreetiliselt võimalik saavutada veel madalamate kontsentratsioonide usaldusväärne määramine. Antud süsteemi eeliseks on väikeste HLA-G koguste kasutamine (~ 12 µl algkontsentratsioon), kiirus ja suutlikkus eristada üksikmolekule, olles kindlalt taganud, et HLA-G on seondunud. Sobivat kamber –või voolutussüsteemi on võimalik kontsentratsiooniga ka alla minna.



Joonis 15. HLA-G „võileib“ Ibidi kambris koos pluronicuga ja vahepealse pesemisetapiga. 30 minutiliste inkubeerimis etappidena lisati 19 nM NA-d; 9.5 nM Biotiin-MEM-G/9-t; 1.2%, 0.375% ja 0.117% alglahuse lahjendust ja 100 pM W6/32-te. Negatiivse kontrollina kasutati DPBS-i.

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös töötati välja TIRF mikroskoopiaal põhinev biosensorsüsteem HLA-G määramiseks, mida oleks võimalik edaspidi kasutada HLA-G määramiseks embrüo kasvulahustest.

Teoreetilises osas anti ülevaade abistavast reprodktiivmeditsiini tehnoloogiast (IVF, ICSI) ja sellega kaasnevates probleemides, eelkõige mitmikrasedusega kaasnevatest ohtudest. Lisaks kirjeldati antus töös HLA-G-d, kuna on leitud, et HLA-G-l on positiivne mõju edukale implantatsioonile ja seega raseduse määra tõstmisele. Kuna antud töös tuvastati HLA-G-d TIRF mikroskoobiga, anti ülevaade ka TIRF mikroskoopiast ja üksikmolekulide määramisest. Samuti kirjeldati antud hetkel saadaolevaid HLA-G süsteeme.

Kuna HLA-G kontsentratsioon embrüo kasvulahustes on suhteliselt madal, on vajadus veelgi tundlikuma biosensorsüsteemi järele. Töö raames töötati välja ja optimeeriti TIRF mikroskoopiaal põhineva biosensor süsteemi erinevaid etappe, et tagada tõhus üksikmolekulide tundlikus. Hindamaks biosensori tõhusust võrreldi saadud tulemusi kommertisaalselt kättesaadava Exbio ELISA kitiga.

Antud katsetest nähtub, et suudetakse saavutada sama suur tundlikus, kui ELISA puhul. Antud sensori puhul on aga eeliseks üksikmolekuli tuvastamise võimalus. Optimeerides erinevaid etappe veelgi, on võimalik saavutada ELISA-st tundlikum süsteem, mida oleks võimalik kasutada HLA-G määramiseks embrüo kasvulahustes.

Käesoleva töö tulemusest on valmimisel artikli käsikiri.

TIRF-microscopy based biosensor system for HLA-G detection

Kairi Tõnsau

SUMMARY

In the current Masters' thesis, a novel TIRF-microscopy based biosensor was developed for quantifying human leucocyte antigen G (HLA-G) in embryo culture medium.

In the theoretical part, an introduction of assisted reproductive technology was given, especially about the in vitro fertilization and the risks that it can cause. Also, an overview of HLA-G was given, since it has been found that sHLA-G could be a marker for the prediction of pregnancy success. Since the biosensor is based on total internal fluorescent microscopy (TIRF), an overview was given about TIRF and how it can be used for the detection of single molecules. Current detection methods for HLA-G quantification were also described.

Because of the small concentration of HLA-G in embryo culture medium, there is a need for more sensitive biosensor systems. In the current work, a TIRF based biosensor was developed and optimized to provide sensitive single molecule detection. To evaluate the effectiveness of the biosensor its sensitivity was experimentally compared to commercially available Exbio ELISA kit.

The results of this work demonstrate that using our approach makes it possible to obtain at least similar sensitivity as with the Exbio ELISA kit. By optimizing the sensor even more, it should be possible to achieve greater sensitivity as TIRF based single-molecule resolution detection systems theoretically have various advantages over the enzymatic ELISA method. In the near future, the performance of the biosensor will have to be tested with real embryoculture medium. As a potential result of the biosensor, the probability of successful in vitro fertilizations should rise.

The results of this work are currently being formed into a manuscript.

TÄNUSÕNAD

Soovin täna eelkõige oma juhendajaid Ago Rinkenit ja Taavi Võsumaad, et nad on mind aastate jookul õpetanud ja nõu andnud.

Samuti soovin tänada ka oma laborikaaslast, eelkõige Anni Allikalt ja Olga Mazinat, kes on iga päeva laboris huvitavaks teinud.

Minu südamlük tänu läheb ka minu perekonnale, kes on kõik need aastad mind toedanud ja edasi õppima suunanud.

KASUTATUD KIRJANDUS

A) Ajakirjad

Ahmed, R., Spikings, E., Zhou, S., Thompsett, A. and Zhang, T. (2014). Pre-hybridisation: An efficient way of suppressing endogenous biotin-binding activity inherent to biotin-streptavidin detection system. *J. Immunol. Methods.* 2014 Apr;406:143-7.

Alegre, E., Diaz-Lagares, A., LeMaout, J., Lopez-Moratalla, N., Carosella, E. D. and Gonzales, A. (2007). Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum. Immunol.* 68(8):661-7.

Arslan., G., Özmen, M., Gündüz, B., Zhang, X. And Ersöz. (2006). Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. *Turk. J. Chem.* 30(2):203-210.

Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell. Biol.* 89(1):141-5.

Axelrod, D. (2001). Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic.* 2(11):764-74.

Bainbridge, D., Ellis, S., Bouteiller, P. L. And Sargent, I. (2001). HLA-G remains a mystery. *Trends. Immunol.* 22(10):548-52.

Bouteiller, P. L and Mallet, V. (1997). HLA-G and pregnancy. *Rev. Reprod.* 2(1):7-13

Carosella, E. D., Moreau, P., Le Maout, J., Le Discorde, M., Dausset, J. and Rouas-Freiss, N. (2003). HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.* 81:199-252.

Cecati, M., Giannubilo, S. R., Emanuelli, M., Tranquilli, A. L. and Saccucci, F. (2011). HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Med. Hypotheses.* 76(6):782-4.

Corrie, S. R., Feng, Q., Blair, T., Hawes, S. E., Kiviat, N. B. and Trau, M. (2011). Multiplatform comparison of multiplexed bead arrays using HPV genotyping as a test case. *Cytometry A.* 79(9):713-9.

Dahl, M. and Hviid, T. M. (2012). Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update.* 18(1):92-109.

Durmanova, V., Homolova, M., Drobny, J., Shawkatova, I. and Buc, M. (2013). Role of HLA-G and other immune mechanisms in pregnancy. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(3):226-39.

Ellis, S. A., Sargent, I. L., Redman, C. W. and McMichael, A. J. (1986). Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology.* 59(4): 595-601.

- Fisch, J. D., Keskinetepe, L., Ginsburg, M., Adamowicz, M. and Sher, G. (2007). Graduated Embryo Score and soluble human leukocyte antigen-G expression improve assisted reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer. *Fertil. Steril.* 87(4):757-63.
- Fuzzi, B., Rizzo, R., Criscuoli, L., Noci, I., Melchiorri, L., Scarselli, B., Bencini, E., Menicucci, A. and Baricordi, O. R. (2002). HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 32:311–15.
- Gun., J., Rizkov, D., Lev, O., Abouzar, M. H., Poghossian, A. and Schöning, M. J. (2008). Oxygen plasma-treated gold nanoparticle-based field-effect devices as transducer structures for bio-chemical sensing. *Microchim. Acta.* 164(3-4):395-04.
- Hackmon, R., Hallak, M., Krup, M., Weitzman, D., Sheiner, E., Kaplan, B. and Weinstein, Y. (2000). HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn. Ther.* 19(5), 404-9.
- Heidari, M. H., Novin, M. G., Ahmadi, F., Khorshid, M., Najafi, T., Molouki, A., Salehpour, S., Bandehpour, M., Heidari, M. and Sato, E. (2011). Increase in concentration of soluble HLA-G in high-quality embryos after intracytoplasmic sperm injection. *Anat. Cell. Biol.* 44(4):331-36.
- Hu, C., Dou, W. and Zhao, G. Enzyme immunosensor based on gold nanoparticles electroposition and Streptavidin-biotin system for detection of *S. pullorum* & *S. gallinarum*. *Electrochim. Acta.* 117:239-45.
- Huang, J. Y. and Rosenwaks, Z. (2012). In vitro fertilisation treatment and factors affecting success. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 26(6):777-78.
- Hunt, J. S., Langat, D. K., McIntire, R. H. And Morales, P. J. (2006). The role of HLA-G in human pregnancy. 4(1): S10.
- Hunt, J. S., Petroff, M. G., McIntire, H. R. and Ober, C. (2005). HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 19(7):681-93.
- Ishitani, A. and Geraghty, D. E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(9):3947-51.
- Jain, A., Liu, R., Xiang, Y. K. and Ha, T. (2012). Single-molecule pull-down for studying protein interactions. *Nat. Protoc.* 7(3):445-52.
- Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C. and Ha, T. (2008). Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 77:51-76.
- Juriscova, A., Casper, R. F., MacLusky, N. J., Mills, G. B. and Librach, C. L. (1996). HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(1):161-5.

- LeMaoult, J., Le Discorde, M., *et al.* (2003) Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens*. 62(4): 273–284.
- Marti, S., Marcos, P., Artachio, M. J., Galan, F. J., Bernabeu, R. and Rubio, G. (2007). Quantifying soluble HLA-G in supernatants of cultured embryos as a marker of implantation potential in an assisted reproduction program. 26(3):127-34.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S and Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PloS Med*. 9(12): 1-12.
- Nguyen, T. T., Krystal, L. and Conboy, J. C. (2012). Comparison of the Energetics of Avidin, Streptavidin, NeutrAvidin, and Anti-Biotin Antibody Binding to Biotinylated Lipid Bilayer Examined by Second-Harmonic Generation. *Anal. Chem*.84 (1):201–208.
- Nguyen, T. T., Krystal, L. and Conboy, J. C. (2012). Comparison of the Energetics of Avidin, Streptavidin, NeutrAvidin, and Anti-Biotin Antibody Binding to Biotinylated Lipid Bilayer Examined by Second-Harmonic Generation. *Anal. Chem*.84 (1):201–208.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Chang, S., Jin, M. and Ahn, K. (2001). The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity*. 15(2):213-24.
- Paul-Simon, A. (2011). Infertility and multiples. *Newborn Infant Nurs. Rev*. 11(4):180-4.
- Pfeiffer, K. A., Rebmann, V., Pässler, M., van der Ven, K., Krebs, D. and Gross-Wilde, H. (2000). Soluble histocompatibility antigen levels in early pregnancy after IVF. *Hum. Immunol*. 61(6), 559-64.
- Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B. and Gauglitz. (2000). A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosens. Bioelectron*. 15(9-10):473-81.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2006). Multiple pregnancy associated with infertility therapy. *Fertil. Steril*. 86(5):106-110.
- Rasnik, I., McKinney, S. A. and Ha, T. (2005). Surfaces and orientations: much to FRET about? *Acc. Chem. Res*. 38(7):542-8.
- Rebmann, V., LeMaoult, J., Rouas-Freiss, N. Carosella, E. D. and Gross-Wilde, H. (2007). Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. *Tissue Antigens*. 69(1):143-9.
- Rebmann, V., Switala, M., Eue, I. and Gross-Wilde, H. (2010). Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum. Reprod*. 25(7):1691-8.

- Rebmann, V., Switala, M., Eue, I., Schwahn, E., Merzenich, M. And Gross-Wilde, H. (2007). Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum. Immunol.* 68(4):251–258.
- Rizzo, R., Melchiorri, L., Stignani, M. and Baricordi, O. R. (2007). HLA-G Expression is a Fundamental Prerequisite to Pregnancy. *Hum. Immunol.* 68(4):244-50.
- Rizzo, R., Vercammen, M., van de Velde, H., Horn., P. A. and Rebmann, V. (2011). The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol. Life. Sci.* 68(3):341-52.
- Roussev, R. G. and Coulam, C. B. (2007). HLA-G and its role in implantation (review). *24(7):288-95.*
- Sageshima, N., Shobu, T., Awai, K., Hashimoto, H., Yamashita, M., Takeda, N., Odawara, Y., Nakanishi, M., Hatake, K. and Ishitani, A. (2007). Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: A reassessment of sHLA-G detection methods. *J. Reprod. Immunol.* 75(1):11-12.
- Sageshima, N., Shobu, T., Awai, K., Hashimoto, H., Yamashita, M., Takeda, N., Odawara, Y., Nakanishi, M., Hatake, K. and Ishitani, A. (2007). Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: A reassessment of sHLA-G detection methods. *J. Reprod. Immunol.* 75(1):11-12.
- Sargent, I. L. (2005). Does 'soluble' HLA-G really exist? Another twist to the tale. *Mol. Hum. Reprod.* 11(10):695-8.
- Steer, C. V., Mills, C. L., Campbell, S. and Edwards, R. G. (1992). The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum. Reprod.* 7(1):117-9.
- Steinborn, A., Varkonyi, T., Scharf, A., Bahlmann, F., Klee, A. and Sohn, C. (2007). Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57(4):277-286.
- Step toe, P. C. and Edwards, R. G. (1978). Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2:366.
- Tessler, L. A. and Mitra, R. D. (2011). Sensitive single-molecule protein quantification and protein complex detection in a microarray format. *Proteomics.* 11(24):4731-5.
- Wang, J. and Sauer, M. V. (2006). In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2(4):355-64.
- Warner, C. M., Lampton, P. W., Newmark, J. A. and Cohen, J. (2008). Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success. *Reprod. Biomed. Online.* 17(4):470-85.

World Health Organization. Current Practices and Controversies in Assisted Production. Geneva, Switzerland; 2002.

Wunder, D. M., Birkhäuser, M. H., Bersinger, N. A. (2013). Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in follicular fluid and embryo culture medium and its impact on pregnancy prediction in IVF-ICSI treatment. *Immuno-anal. Biol. Spe.* 28(1):43-50.

Yao, Y. Q., Barlow, D. H. And Sargent, I. L. (2005). Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J. Immunol.* 175(12):8379-85.

Yie, S. M., Taylor, R. N. and Librach, C. (2005). Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193(1): 204-208.

B) Raamatud:

Adamson, G. D and Baker, V. L. 2004. Infertility, overview, p. 6-13. In L. Martini (ed.), *Encyclopedia of Endocrine Disease*, vol.3. Academic Press, San Diego, California.

Baker, H. N., Murphy, R. and Garcia, C. (2012). Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method. *J. Vis. Exp.* e4084.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. 2002. *Immunology Provides Important Techniques with Which to Investigate Proteins*. In *Biochemistry*. 5th ed. Granite Hill Publishers, New York.

Janeway, C. A., Walport, M. J., Travers, P. and Sholmchic, M. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed., vol.1. Garland Pub., New York.

Speroff, L. and Fritz, M. 2005. Implantation, p. 48-54. In Clinical gynecologic endocrinology and infertility, p.48-54. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). ART fact sheet. URL (kasutatud 24.05.2014) <http://www.eshre.eu/guidelines-and-legal/art-fact-sheet.aspx>
2. <http://www.cdc.gov/art/> (25.05.2014)
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0002173/> (kasutud 25.05.2014)
4. <http://www.ncl.ac.uk/bioimaging/techniques/tirfm/> (kasutatud 26.05.2014)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina

Kairi Tõnsau

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 10.08.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

TIRF MIKROSKOOPIAL PÕHINEV BIOSENSOR SÜSTEEM HLA-G MÄÄRAMISEKS

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on

Ago Rinken, Taavi Võsumaa

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **06.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2014**